BAND 42, HEFT 3 SEPTEMBER 1961

PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. SCHAFFNIT

Unter Mitwirkung von

Prof. Dr. E. BALDACCI, Mailand / Prof. Dr. H. BRAUN, Bonn / Prof. Dr. W. B. BRIERLEY, Keswick-Cumberland / Prof. Dr. N. HIRATSUKA, Tokyo / Oberreg.-Rat i. R. Dr. E. KÖHLER, Braunschweig / Prof. Dr. K. O. MÜLLER, Canberra / Prof. Dr. T. S. SADASIVAN, Madras / Prof. Dr. TR. SAVULESCU, Bukarest / Prof. Dr. K. SILBERSCHMIDT, São Paulo / Prof. Dr. E. C. STAKMAN, St. Paul

herausgegeben von den Professoren

E. GÄUMANN
Zürich

M. KLINKOWSKI
Aschersleben

H. RICHTER
Berlin-Dahlem

Mit 33 Abbildungen

1961

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Phytopath. Z. Bd. 42 Heft 3 S. 197—304 Berlin 1961

Postverlagsort Berlin

INHALT

Abhandlungen

STOLP, H., Neue Erkenntnisse über phytopathogene Bakterien und die von ihnen verursachten Krankheiten. I. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" und saprophytischen Fluoreszenten auf der Grundlage von Phagenreaktionen. Mit 11 Abb. 197

HEIN, ALICE, Verhinderung der Kontaktübertragung des Tabakmosaik-Virus durch Magermilch 263

SCHNEIDER, ROSWITHA, Untersuchungen über das Auftreten der *Guignardia*-Blattbräune der Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum*) in Westdeutschland und ihren Erreger. Mit 5 Abb. 272

KRISTEV, K., On the Role of Pyrophosphate Metabolism in the Respiratory Increase of Rust-Infected Wheat Leaves. With one Figure 279

KRÜGER, W., Das Schicksal von Antibiotika in Tomatenpflanzen. I. Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Pflanzen. Mit 9 Abb. 286

MOORE, ROYALL T., and JAMES H. MCALEAR, Fine Structure of Mycota. 8. On the Aecidial Stage of *Uromyces caladii*. With 7 figures 297

Manuskripte: In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

Herausgeber: Prof. Dr. E. GÄUMANN, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Prof. Dr. M. KLINKOWSKI, Aschersleben, Theodor-Roemer-Weg 4, und Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 19. Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, oder an einen der drei Herausgeber.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. RICHTER, Berlin-Dahlem. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. RICHTER vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

Honorierung: Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen und Buchbesprechungen sind honorarfrei.

Sonderdrucke: Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 30 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen), Mehrbedarf gegen Berechnung.

Vorbehalt aller Rechte, insbesondere auch der photomechanischen Vervielfältigung: Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe sind vorbehalten. Gewerblichen Unternehmen wird die Anfertigung einer photomechanischen Vervielfältigung von Beiträgen oder Beitragsteilen für den innerbetrieblichen Gebrauch durch Photokopie, Mikrokopie und dergleichen, nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens vom 14. 6. 1958, gegen Bezahlung der dort vorgesehenen Gebühr bis zu 3 Exemplaren gestattet. Die Vervielfältigungen haben einen Vermerk über die Quelle und den Vervielfältiger zu tragen. Die in dem Rahmenabkommen vorgesehene Gebühr ist an die Inkassostelle für Photokopiergebühren beim Börsenverein des Deutschen Buchhandels e. V., Frankfurt/M., Gr. Hirschgraben 17-19, zu entrichten. Erfolgt die Entrichtung der Gebühren durch Wertmarken der Inkassostelle, so ist für jedes Photokopierblatt eine Marke im Werte von DM 0,30 zu verwenden. Mit der Überlassung des Manuskriptes überträgt der Verfasser dem Verlag das Recht zu dieser Genehmigung.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 10—12 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jedes Heft enthält etwa 7 Druckbogen.

Bezugsbedingungen: Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 3,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich. Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang des letzten Heftes des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

Verlag: Paul Parey, Berlin und Hamburg, Berlin SW 61, Lindenstraße 44/47, Telefon 61 44 68/69.
Printed in Germany (Westberlin).

Abonnementspreis dieses Heftes 28,— DM **Einzelpreis 30,80 DM**

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Bakteriologie, Berlin-Dahlem

Neue Erkenntnisse über phytopathogene Bakterien und die von ihnen verursachten Krankheiten

I. Verwandtschaftsbeziehungen zwischen phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" und saprophytischen Fluoreszenten auf der Grundlage von Phagenreaktionen

Von

H. Stolp

Mit 11 Abbildungen

Was bis heute über die phytopathogenen Bakterien bekannt geworden ist und in den einschlägigen Lehr- und Handbüchern (Stapp 1956, 1958, Dowson 1957, Israilski 1955) ausführlich dargelegt wird, läßt sich in großen Zügen wie folgt zusammenfassen:

1. Durch Bakterien verursachte Krankheiten sind bei zahlreichen Pflanzenarten festgestellt worden.

2. Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology" (7. Auflage, 1957) unterscheidet etwa 200 phytopathogene Bakterien: 91 *Pseudomonas*-, 60 *Xanthomonas*-, 17 *Erwinia*- sowie einige *Agrobacterium*- und *Corynebacterium*-„Arten".

3. Über die morphologischen Eigenschaften, die physiologischen Leistungen und die Wirkungsweise in der infizierten (erkrankten) Pflanze liegen für die einzelnen Erreger mehr oder weniger eingehende Untersuchungsergebnisse vor.

4. Von phytopathogenen Bakterien können Nekrosen, Welkeerscheinungen, Naßfäulen oder auch Gewebswucherungen (Tumoren) verursacht werden.

5. Obwohl bestimmte phytopathogene und saprophytische Bakterien in morphologisch-cytologischer Hinsicht und in bezug auf physiologische und biochemische Leistungen — mit Ausnahme der Pathogenität — keine prinzipiellen Unterschiede zeigen, wird im allgemeinen die Auffassung vertreten, daß Saprophyten und Parasiten im Bereich der Phytopathologie nichts miteinander zu tun haben. So wird von Stapp (1955) mit Nachdruck darauf hinge-

wiesen, daß die saprophytischen Fluoreszenten „nicht für das plötzliche Auftreten bakterieller Seuchen unter den Kulturpflanzen verantwortlich gemacht werden können".

6. Der Ausbruch von Bakteriosen ist nach der heutigen Lehrmeinung nur dann möglich, wenn die „spezifischen" Erreger (als Vertreter bestimmter „Arten") in das Befallsgebiet eingeschleppt worden sind oder in latenten Infektionsherden bereits vorhanden waren. CROSSE (1957) ist der Ansicht, daß "most primary infections arise from bacteria carried into the crop with seed, tubers, cuttings and nursery trees, etc., and in the same way bacteria have been transmitted to hitherto disease-free areas".

7. Die epidemische Ausbreitung von Bakteriosen setzt neben der Anwesenheit der Erreger bestimmte klimatische Verhältnisse voraus. Über die Ursachen einer Epidemie ist im einzelnen nur wenig bekannt, aber es ist sicher, daß Temperatur und Feuchtigkeit eine große Rolle spielen.

8. Die Bekämpfungsmöglichkeiten sind — abgesehen von wenigen Ausnahmen — begrenzt. Eine kurative Behandlung bereits erkrankter Pflanzenbestände ist auch mit den in der medizinischen Bakteriologie sehr erfolgreich eingesetzten Antibioticis nur in Einzelfällen möglich. Daher liegen die Kontrollmaßnahmen in erster Linie auf prophylaktischem Gebiet. Wenn z. B. bestimmte Insekten für die Ausbreitung eines pathogenen Bakteriums verantwortlich sind, dann kann die betreffende Bakteriose durch Vernichtung der Vektoren indirekt bekämpft werden. Wird ein Erreger durch Kulturmaßnahmen von kranken auf gesunde Pflanzen übertragen, dann läßt sich der Bakterienbefall — vorausgesetzt, daß der ursächliche Zusammenhang erkannt worden ist — durch Änderung der Kulturtechnik reduzieren. Eine weitere Möglichkeit, Bakteriosen auszuschalten, liegt in der Züchtung resistenter Sorten. Schließlich versucht man auch, durch Quarantänemaßnahmen einer Ausbreitung von bestimmten Bakterienkrankheiten entgegenzutreten.

Wenn die phytopathogenen Bakterien gegenwärtig in etwa 200 „Arten" eingeteilt werden, dann geschieht das in der Überzeugung, daß sich die Vertreter der einzelnen „Arten" in charakteristischer Weise unterscheiden. Nach welchen Gesichtspunkten und auf Grund welcher Tatsachen die zahlreichen „Arten" aufgestellt worden sind, zeigt am besten ein Rückblick auf die historische Entwicklung in der Bakteriosenforschung: Als in den letzten Jahrzehnten des vergangenen Jahrhunderts der Beweis dafür erbracht wurde, daß bestimmte Krankheiten bei Mensch und Tier durch Bakterien verursacht werden, war es naheliegend, Bakterien auch als Erreger von Pflanzenkrankheiten zu vermuten. In der Tat konnte schon wenige Jahre nach der Entdeckung humanpathogener Bakterien die Existenz phytopathogener Bakterien nachgewiesen werden. Inzwischen sind zahlreiche Krankheiten und ihre Erreger beschrieben worden. Bei der Entdeckung einer neuen Bakteriose ist der „Gang der Handlung" immer der gleiche: Man beobachtet eine bisher unbekannte Pflanzenkrankheit und vermutet, daß es sich um eine Bakteriose handelt. Wenn der Nachweis von Bakterien gelingt, dann wird festgestellt, ob die Isolierung pathogene Eigenschaften besitzt. Treten bei künstlicher Infektion gesunder Pflanzen die glei-

chen Krankheitssymptome auf, wie sie die spontan befallene Pflanze gezeigt hat[1]), dann ist der Beweis dafür erbracht, daß es sich bei der untersuchten Krankheit um eine Bakteriose handelt. Die Einordnung des Erregers in das System der Bakterien erfordert einen Vergleich mit den schon bekannten pathogenen Bakterien. Es muß festgestellt werden, ob die Isolierung in ihren Eigenschaften mit bereits beschriebenen „Arten" identisch ist oder als eine bis dahin unbekannte, neue Bakterien-„Art" zu gelten hat. Wie kann man nun die Identität der Eigenschaften bei verschiedenen Isolierungen ermitteln? Bei der Untersuchung dieser Frage muß man sich zunächst darüber klar sein, daß die „Art"-Bestimmung der Bakterien grundsätzlich anders verläuft als die Identifizierung von höheren Organismen. Tiere und höhere Pflanzen werden im wesentlichen auf der Grundlage des morphologischen Vergleichs identifiziert. Da die morphologischen Unterschiede bei den Bakterien nur eine grobe Einteilung zulassen, müssen für ihre Differenzierung zusätzlich und in erster Linie physiologische Eigenschaften herangezogen werden. Bei einem physiologischen Test werden aber — im Gegensatz zur morphologischen Untersuchung eines Organismus — nicht die „persönlichen" Fähigkeiten einzelner Individuen, sondern die „kollektiven" Leistungen von Populationen bestimmt. Wenn man die physiologischen Eigenschaften „eines Bakteriums" untersucht, dann muß man berücksichtigen, daß die beobachtete Wirkung aus der Summe der individuellen Aktivitäten der an einer Reaktion beteiligten Einzelzellen (einer Bakterienkultur) resultiert. Das Ergebnis ist statistischer Natur und schließt nicht aus, daß in der untersuchten Population einige wenige Individuen existieren, die sich in ihren Stoffwechselfähigkeiten von der Masse der eine Kultur repräsentierenden Bakterien unterscheiden. Es sei in diesem Zusammenhang nur an das spontane Auftreten biochemischer sowie antibiotika- oder phagenresistenter Mutanten erinnert. Die in der Bakteriologie übliche Formulierung: „Das Bakterium *Pseudomonas* x . . . besitzt die und die Eigenschaften" darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß eine Bakterienkultur, mit der man gewöhnlich arbeitet, im genetischen Sinne eine heterogene Population darstellt. Die Heterogenität tritt jedoch erst dann sichtbar in Erscheinung, wenn sich die von der Norm abweichenden Stoffwechseltypen einer Population selektiv begünstigt entwickeln können.

Für die „Art"-Identifizierung e i n e s Bakteriums (richtiger gesagt: einer Bakterienpopulation) werden verschiedene Angaben über morphologische, physiologische und antigene Eigenschaften, biochemische Leistungen, Pathogenität und anderes mehr herangezogen. Wenn die für eine Bestimmung geforderten Daten vorliegen und der Vergleich mit den im „BERGEY" beschriebenen Bakterien durchgeführt wird, dann wird erfahrungsgemäß sehr häufig festgestellt, daß die Neuisolierung mit keinem bisher schon „bekannten"

[1]) Ob die durch künstliche Infektion hervorgerufenen und die spontan aufgetretenen Symptome übereinstimmen, hängt weitgehend von der Infektionsmethode und von der Art der Erkrankung ab. Die durch Gefäßparasiten verursachten Welkeerscheinungen lassen sich bei künstlicher Infektion meist besser reproduzieren als die durch Blattparasiten hervorgerufenen Nekrosen. Mit Stichinfektionen an Blättern kann zwar die Pathogenität eines Bakteriums erkannt werden, die Symptomausbildung hat mit dem in der Natur auftretenden Krankheitsbild aber nur wenig gemeinsam.

Bakterium exakt, d. h. in allen geprüften Merkmalen, übereinstimmt. Und selbst bei völliger Identität in den untersuchten Eigenschaften kann natürlich nichts darüber ausgesagt werden, ob sich die Bakterien auch bei anderen, nicht geprüften Reaktionen gleichartig verhalten hätten.

Bei der Identifizierung der phytopathogenen Bakterien ist man im allgemeinen etwa folgendermaßen vorgegangen: Wenn ein Bakterium aus einer Pflanze isoliert wurde, für die eine Bakteriose bereits beschrieben war, dann entschloß man sich gewöhnlich, den neu isolierten und den schon bekannten Erreger für identisch zu halten, sofern das gleiche Krankheitsbild vorlag und eine gute Übereinstimmung in den morphologischen und physiologischen Eigenschaften der Bakterien festgestellt werden konnte. Stammte das Bakterium jedoch aus einer Pflanze, die als Wirt für ein parasitisches Bakterium bislang nicht bekannt war, dann hielt man die Isolierung in vielen Fällen für eine neue Bakterien-„Art". Die Nomenklatur der Erreger erfolgt nach genau festgelegten Regeln (AINSWORTH 1948). Bei den phytopathogenen Bakterien bezieht sich der „Art"-Name in vielen Fällen auf die Wirtspflanze (*Ps. tabaci, X. phaseolicola*), gelegentlich auf den Entdecker (*Ps. savastanoi, Ps. tolaasii*), auf Besonderheiten in der Symptomausbildung (*Ps. marginalis, X. translucens, Agr. tumefaciens*) und anderes mehr.

Daß die Klassifizierung (Taxonomie) der Bakterien mit den Fortschritten in der Bakteriologie ständig korrigiert und den jeweiligen Auffassungen über die Beziehungen der Organismen zueinander angepaßt wird, liegt in der Natur der Sache begründet. Nur die Bakterien und die von ihnen verursachten Wirkungen sind eine Realität. Das System ist demgegenüber ein künstliches Ordnungsschema, in dem der Versuch unternommen wird, die an natürlichen Standorten isolierten Bakterien auf Grund von Verschiedenheiten abzugrenzen und auf Grund von Gemeinsamkeiten in höheren systematischen Kategorien zusammenzufassen. Wie das geschieht, hängt nicht zuletzt davon ab, welche Bedeutung welchen Merkmalen zugestanden wird. Die Schwierigkeiten auf der Ebene der „Spezies" ergeben sich in erster Linie aus der Tatsache, daß der „Art"-Begriff aus der Tier- und Pflanzenwelt in die Bakteriensystematik übernommen worden ist. Für die einer „Art" angehörenden höheren Organismen wird die sexuelle Kreuzbarkeit gefordert. Da sich die Bakterien nach unserer heutigen Kenntnis jedoch nur vegetativ vermehren, kann dieses Merkmal für ihre „Art"-Abgrenzung nicht herangezogen werden. Die wenigen bisher bekannt gewordenen Fälle einer Bakterienkonjugation haben an dieser Sachlage vorerst nichts geändert.

In der Gattung *Pseudomonas* werden gegenwärtig — wie schon erwähnt — allein 91 phytopathogene Bakterien-„Arten" unterschieden. Da aus Gründen, auf die im folgenden näher eingegangen wird, Zweifel an der Richtigkeit des derzeitigen „Arten"-Schemas aufgekommen sind, soll in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob die bei den phytopathogenen Pseudomonaden vorgenommene „Arten"-Einteilung eine reale Grundlage hat. Wir wissen heute, daß sich viele Eigenschaften der Bakterien, denen taxonomische Bedeutung zugesprochen wird, durchaus nicht wie „konstante Merkmale" verhalten (COWAN 1959). Bei vergleichenden Untersuchungen hat sich vielfach

gezeigt, daß die Variabilität der physiologischen Eigenschaften bei verschiedenen Stämmen einer „Art" nicht geringer ist als bei Stämmen von verschiedener „Art"-Zugehörigkeit. Da die phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" allein nach physiologischen Merkmalen nicht zu differenzieren sind (BURKHOLDER u. STARR 1948), wird die „spezifische Pathogenität" für ganz bestimmte Wirtspflanzen als das wichtigste „Art"-bestimmende Merkmal angesehen. Der Wert des Systems hängt infolgedessen entscheidend von der Frage ab, ob die den verschiedenen „Arten" zugeordnete „spezifische Pathogenität" tatsächlich existiert oder nur unterstellt wird. Bei der Ermittlung der für ein phytopathogenes *Pseudomonas*-Bakterium anfälligen Wirtspflanzen werden in der Praxis meist nur wenige Pflanzenarten berücksichtigt, so daß die Angaben über den Wirtspflanzenkreis keinen Anspruch auf Vollständigkeit erheben können. Selbstverständlich ist es schon aus arbeitstechnischen Gründen nicht möglich, die Pathogenität eines Bakteriums bei allen in der Natur vorkommenden Pflanzenarten zu überprüfen. Insofern bestehen grundsätzliche Schwierigkeiten, den Wirtsbereich eines phytopathogenen Bakteriums überhaupt eindeutig „festzulegen". Die den einzelnen „Arten" zugeschriebene „spezifische Pathogenität" hat im übrigen dazu beigetragen, daß man die Infektionsversuche zur Ermittlung des Wirtspflanzenkreises meist auf sehr nahe verwandte Pflanzen (einer Familie) beschränkt hat. So ist es verständlich, daß man z. B. auf Infektionsversuche mit *Ps. lapsa* (aus Mais oder Zuckerrohr) an Bohnen, mit *Ps. morsprunorum* (aus *Prunus*-Arten) an Salat, mit *Ps. coronafaciens* (aus Getreide) an Tabak, mit *Ps. tolaasii* (aus Champignon) an Gurken usw. von vornherein verzichtet hat. Die genannten Beispiele lassen erkennen, daß die praktisch unbegrenzten Kombinationsmöglichkeiten von Parasit und Wirt eine zuverlässige Differenzierung der phytopathogenen Pseudomonaden auf der Grundlage eindeutig „festgelegter" Wirtspflanzenkreise unmöglich machen.

Die „Art"-Bestimmung phytopathogener Bakterien nach dem in der Systematik aufgebauten Schema bietet im allgemeinen keine Schwierigkeiten, wenn die Herkunft der Isolierung bekannt ist. Wenn es sich um phytopathogene Fluoreszenten handelt, ist die „Art"-Identifizierung besonders einfach, weil sie sich in vielen Fällen unmittelbar aus der Wirtspflanze ergibt: Aus Sellerie isoliert man *Ps. apii,* aus Saubohnen *Ps. fabae,* aus Gurken *Ps. lachrymans,* aus Erbsen *Ps. pisi,* aus Tomaten *Ps. tomato* ... usw. Versucht man dagegen, eine pathogene Kultur ohne jeden Hinweis auf ihre Herkunft zu identifizieren, dann wird die Bestimmung der „Art"-Zugehörigkeit zu einem Problem. Besonders aussichtslos ist der Versuch, phytopathogene Fluoreszenten unbekannter Herkunft zu identifizieren. Es besteht kein Zweifel, daß man bei der „Art"-Bestimmung einer höheren Pflanze oder eines Insekts eher zu einem eindeutigen Ergebnis kommt. Die Schwierigkeiten bei den Bakterien deuten schon darauf hin, daß die derzeitige Systematik äußerst unbefriedigend ist.

Nach der systematischen Ordnung müssen zwischen verschiedenen Isolierungen einer „Art" nähere Verwandtschaftsbeziehungen vorliegen als zwischen verschiedenen „Arten" untereinander. In der vorliegenden Arbeit wird überprüft, ob diese Forderung bei „authentischen" *Pseudomonas*-Kultu-

ren erfüllt ist. Gleichzeitig werden die Beziehungen zwischen parasitischen und saprophytischen Fluoreszenten untersucht. Die Beurteilung der verwandtschaftlichen Zusammenhänge erfolgt auf der Grundlage von Phagenreaktionen.

Seit einigen Jahren spielen Bakteriophagen[1]) in verschiedenen Disziplinen der Biologie, vor allem in der theoretischen Virusforschung und der Genetik, eine bedeutende Rolle. Wir wissen inzwischen, wie Bakteriophagen aussehen, kennen ihren chemischen Aufbau und haben gut fundierte Kenntnis von dem Prozeß der Phagenvermehrung in der infizierten Zelle. Neuerdings wird den lysogenen Bakterien, die durch eine Integration von Virusnukleinsäure und bakteriengenetischem Material ausgezeichnet sind, sowie der Transduktion, bei der durch Phagen Eigenschaften von einer Bakterienzelle auf eine andere übertragen werden, im Zusammenhang mit genetischen Grundproblemen besonderes Interesse entgegengebracht. Da sich die Phagenvermehrung in einer Bakterienzelle auf genetischer Ebene abspielt und die gemeinsame Phagensensibilität verschiedener Bakterienisolierungen auf einer Ähnlichkeit in ihrer genetischen Struktur beruht, ist es möglich, auf der Grundlage von Phagenreaktionen natürliche Verwandtschaftsbeziehungen aufzuklären. Darauf hat erstmals STOCKER (1955) hingewiesen. In der Phytopathologie hat man sich schon vor Jahrzehnten einmal sehr intensiv mit der durch Phagen hervorgerufenen Bakterienlysis beschäftigt. Im Mittelpunkt der damaligen Untersuchungen stand ihre Nutzbarmachung für therapeutische Zwecke. Da sich die spekulativen Hoffnungen auf eine Phagentherapie der Pflanzenkrankheiten nicht erfüllten, war das Interesse nur von kurzer Dauer. Mit dem Aufschwung der allgemeinen Phagenforschung seit den 40er Jahren sind auch in der Phytopathologie die Bakteriophagen wieder etwas mehr in den Vordergrund getreten. Die bisher vorliegenden Phagen-Arbeiten konzentrierten sich im wesentlichen auf zwei Probleme: 1. Die „Art"-Identifizierung und 2. den Nachweis phytopathogener Bakterien in erkrankten Pflanzengeweben (ohne Isolierung der Erreger). Bei diesen Untersuchungen ging man meist von der Vorstellung aus, daß die Existenz der im Bakteriensystem aufgeführten „Arten" eine naturgegebene Tatsache ist, und daß es folglich mit Hilfe von „Art"-spezifischen Phagen möglich sein müßte, die verschiedenen Erreger-„Arten" nachzuweisen und zu identifizieren. Da sich die Bakteriophagen im Sinne der systematischen Ordnung jedoch meist als „unspezifisch" erwiesen haben, wird ihre Bedeutung für die Identifizierung der phytopathogenen Bakterien sehr unterschiedlich beurteilt. Über diese Frage wird in der Diskussion noch ausführlich zu sprechen sein.

Die eigenen Untersuchungen wurden an etwa 150 phytopathogenen und 200 saprophytischen *Pseudomonas*-Kulturen durchgeführt. Als Untersuchungsobjekt wurden bewußt die *Pseudomonas*-„Arten" ausgewählt, da die zu ihnen zählenden Fluoreszenten als Krankheitserreger von Kulturpflanzen eine wichtige Rolle spielen. Nach STAPP (1956) gehören die Fluoreszenten „zu den gefürchtetsten Parasiten, weil sie sich unter für sie günstigen Bedingungen in kürzester Frist über große Strecken geschlossener Bestände zu verbreiten vermögen und sehr hohe Ernteminderungen zur Folge haben können".

[1]) Zur Unterrichtung über die Phagenforschung auf den verschiedensten Gebieten wird auf LURIA (1953), ADAMS (1959) sowie BURNET und STANLEY (1959) verwiesen.

MATERIAL UND METHODEN

1. Die verwendeten Nährsubstrate

a) Fl: 1000 ml Aqua dest., 5 g Nutrient broth (Difco), 3 g Casamino acids (Difco), 0,6 g Yeast extract (Difco), pH = 6,5;

b) YE (nach Rhodes 1959): 1000 ml Aqua dest., 3 g Yeast extract (Difco), 10 g Bacto Pepton (Difco), 5 g NaCl, pH = 6,8 bis 7,0;

c) Di: 1000 ml Aqua dest., 5 g Dextrose ,5 g Nutrient broth (Difco), 500 mg Casamino acids (Difco), 100 mg Yeast extract (Difco), pH = 6,8 bis 7,0;

d) D: 1000 ml Aqua dest., 10 g Dextrose, 5 g Pepton (Brunnengräber), 500 mg K_2HPO_4, 200 mg $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$, 5 mg $FeSO_4$, 2 g $CaCO_3$;

e) A: 1000 ml Aqua dest., 8 g Nutrient broth (Difco), 5 g Casamino acids (Difco), 1 g Yeast extract (Difco), 200 mg $Ca(NO_3)_2$, 10 mg $FeSO_4$, 10 mg $MnSO_4$, pH = 7,0;

f) C: 1000 ml Aqua dest., 8 g Nutrient broth (Difco), Salze und pH wie unter e).

Für welchen Zweck die verschiedenen Nährsubstrate Verwendung gefunden haben, geht aus den weiteren Ausführungen hervor. Zur Herstellung fester Nährböden erhielten die Substrate einen Zusatz von 1,9 % Agar. Die Sterilisation erfolgte im allgemeinen bei 122 °C für 30 Min. (Autoklav).

2. Die in die Untersuchung einbezogenen Bakterien

a) Bodenfluoreszenten

Aus Bodenproben verschiedener Herkunft wurden insgesamt 204 grünfluoreszierende Bakterienstämme vom Typ *„Pseudomonas fluorescens"* isoliert. Die Isolierung erfolgte nach dem Plattengußverfahren unter Benutzung des Nährbodens Fl, auf dem Kolonien mit Fluoreszenzbildung deutlich in Erscheinung traten. Von den sich aus einer Probe entwickelnden Fluoreszenten wurde nur jeweils ein Stamm isoliert. Die Gewinnung von Reinkulturen erfolgte durch mehrfachen Plattenguß und fraktionierten Ausstrich der jeweiligen Isolierung. Stammkulturen wurden auf Fl-Schrägröhrchen gehalten und in Abständen von etwa drei Monaten überimpft. Ihre Lebensdauer war erheblich länger, wenn die Kulturen mit sterilem Paraffinöl überschichtet wurden. Die Überimpfung solcher Dauerkulturen war nur einmal im Jahr erforderlich.

b) Phytopathogene *Pseudomonas*-„Arten"

Die Mehrzahl der in die Untersuchung einbezogenen phytopathogenen *Pseudomonas*-Kulturen wurde von Fachkollegen oder aus der ATCC (American Type Culture Collection) beschafft[1]). In Tabelle 1 sind alle untersuchten *Pseudomonas*-Stämme (Bodenfluoreszenten und Pflanzenparasiten) mit Angaben über ihre Herkunft sowie das Nährsubstrat, auf dem die Stammkulturen gehalten wurden, zusammengestellt. Die Numerierung der Kulturen erfolgte

[1]) Einen großen Teil der authentischen Kulturen haben freundlicherweise Dr. W. A. Clark, Direktor der ATCC in Washington, Dr. M. E. Rhodes, Universität Reading (England), Dr. Z. Klement, Budapest (Ungarn) und Dr. R. Mushin, Universität Melbourne (Australien), zur Verfügung gestellt.

Tabelle 1

Die untersuchten Bakterienkulturen

Erläuterungen: NCTC = National Collection of Type Cultures (England)
ATCC = American Type Culture Collection (USA)
BBA = Sammlung der Biologischen Bundesanstalt Berlin-Dahlem

Kultur Nr.	Spezies	Herkunft	Nährboden
1 bis 204	Grün-fluoreszierende Bakterien vom Typ *Ps. fluorescens*	Bodenproben aus: Berlin, Westdeutschland, Luxemburg, Belgien	Fl
205	*Ps. morsprunorum*	Isolierung aus *Prunus triloba* BBA 1956	YE
206	*Ps. tabaci*	NCTC, Cambridge 1953. Reisolierung des Originalstammes aus infiziertem Tabak	A
207	*Ps. fluorescens liquefaciens*	BBA 1954	A
208	*Ps. morsprunorum*	Isolierung aus Zwetsche Heidelberg, BBA 1956	A
209	*Ps. morsprunorum*	Stamm Dowson, erhalten von NILSSON (Schweden)	YE
210	*Ps. phaseolicola*	NCTC, Cambridge 1953	Di
211	*Ps. phaseolicola*	USA- Peoria, Illinois, 1953, NRRL — B 845	YE
212	*Ps.* sp.	Isolierung aus Hyazinthe BBA	A
213	*Ps.* sp.	Isolierung aus Hyazinthe BBA	A
215	*Ps. fluorescens*	BBA	A
219	*Ps. rimaefaciens*	Isolierung aus *Populus*, Hann.-Münden, BBA 1957	A
220	*Ps. intybi*	BBA, Berlin 1931	A
221	*Ps. tonelliana*	BBA	A
222	*Ps. phaseolicola*	Reisolierung von 228 aus Goldhorn, BBA	YE
223	*Ps. phaseolicola*	Reisolierung von 228 aus Andreas, BBA	YE
224	*Ps. phaseolicola*	Reisolierung von 228 aus Flieder, BBA	YE
225	*Ps. phaseolicola*	Reisolierung von 228 aus Granda, BBA	YE
226	*Ps. phaseolicola*	BBA (Institut für Mykologie)	YE
228	*Ps. phaseolicola*	BBA	YE
229	*Ps. tabaci*	NCTC, Cambridge 1953	A
230	*Ps. tabaci*	Reisolierung von Bohne, BBA	A
231	*Ps. tabaci*	BBA, virulent Typ 1	A
232	*Ps. tabaci*	BBA, virulent Typ 2	A
233	*Ps. tabaci*	USA, Peoria, Illinois, 1953, NRRL — B 877	YE
234	*Ps. pyocyanea* (= *aeruginosa*)	BBA	A
235	*Ps. tabaci*	BBA, Reisolierung aus Sauerkirsche	A
236	*Ps. tabaci*	BBA, avirulent Typ 2	A
237	*Ps. tabaci*	BBA, avirulent Typ 3	A
238	*Ps. syringae*	KLEMENT (Ungarn) N 086	Di

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Kultur Nr.	Spezies	Herkunft	Nährboden
239	*Ps. syringae*	KLEMENT (Ungarn) I 201	A
240	*Ps. lachrymans*	KLEMENT (Ungarn) R 016	A
241	*Ps. morsprunorum*	CROSSE (England), 1959	YE
243	*Ps. cannabina*	KLEMENT (Ungarn) L 02	A
244	*Ps. mori* var. *huszei*	KLEMENT (Ungarn) T 06	A
245	*Ps. caryophylli*	BBA, HANTSCHKE, 1959	D
246	*Ps. caryophylli*	BBA, HANTSCHKE, 1959	D
247	*Ps. coronafaciens*	KNÖSEL (Hohenheim)	A
248	*Ps. coronafaciens*	KNÖSEL (Hohenheim), Stamm 9005 der ATCC	YE
249	*Ps. marginalis*	ATCC 10844	D
250	*Ps. primulae*	ATCC 10860	YE
251	*Ps. cattleyae*	ATCC 10200	YE
252	*Ps. apii*	ATCC 8722	D
253	*Ps. tomato*	ATCC 10862	YE
254	*Ps. marginata*	ATCC 10247	YE
255	*Ps. barkeri*	ATCC 6876	D
256	*Ps. stizolobii*	ATCC 12636	YE
257	*Ps. atrofaciens*	ATCC 9004	A
258	*Ps. glycinea*	ATCC 8727	YE
259	*Ps. delphinii*	ATCC 8719	A
260	*Ps. tabaci*	ATCC 11527	YE
261	*Ps. syringae*	ATCC 12273	YE
262	*Ps. phaseolicola*	ATCC 11365	YE
263	*Ps. lachrymans*	ATCC 11965	YE
264	*Ps. cepacia*	ATCC 10856	D
265	*Ps. coronafaciens*	ATCC 9005 (identisch mit Stamm 248)	YE
266	*Ps. cichorii*	ATCC 10857	Di
267	*Ps. papulans*	ATCC 7389	YE
268	*Ps. lapsa*	ATCC 10859	D
269	*Ps. fragi* (Kein Pflanzenparasit!)	ATCC 4973	YE
270	*Ps. solanacearum*	ATCC 11697	Di
271	*Ps. caryophylli*	ATCC 11441	Di
272	*Ps. tolaasii*	ATCC 12528	YE
273	*Ps. aptata*	ATCC 10205	YE
274	*Ps. alliicola*	ATCC 10854	Di
275	*Ps. medicaginis* var. *phaseolicola*	RHODES (d 52)	YE
276	*Ps. viridiflava*	RHODES (d 53)	YE
277	*Ps. ·avastanoi*	RHODES (d 64)	YE
278	*Ps ·laasii*	RHODES (d 69)	YE
279	*Ps. delphinii*	RHODES (d 72)	YE
280	*Ps. mori*	RHODES (d 73)	YE
281	*Ps. primuli*	RHODES (d 133)	YE

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Kultur Nr.	Spezies	Herkunft	Nährboden
282	*Ps. viridilivida*	RHODES (d 152)	YE
283	*Ps. tabaci*	RHODES (d 221)	YE
284	*Ps. lachrymans*	RHODES (d 236)	YE
285	*Ps. barkeri*	RHODES (d 244)	YE
286	*Ps. atrofaciens*	RHODES (d 248)	YE
287	*Ps. cruciviae* (Kein Pflanzenparasit!)	RHODES (d 251)	YE
288	*Ps. aptata*	RHODES (d 260)	YE
289	*Ps. angulata*	RHODES (d 263)	YE
290	*Ps. morsprunorum*	RHODES (d 270)	YE
291	*Ps. syringae*	RHODES (d 281)	YE
292	*Ps. marginalis*	RHODES (d 289)	YE
293	*Ps. pisi*	RHODES (d 300)	YE
294	*Ps. fluorescens*	RHODES, NCTC 5940 } Keine	YE
295	*Ps. chlororaphis*	RHODES, NCTC 7357 } Pflanzen-	YE
296	*Ps. hydrophila*	RHODES, NCTC 7810 } parasiten	YE
297	*Ps.* sp.[1])	RHODES (47/1)	YE
298	*Ps.* sp.	RHODES (52/1)	YE
299	*Ps.* sp.	RHODES (7/3)	YE
300	*Ps.* sp.	RHODES (25/1)	YE
301	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 510	YE
302	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 511	YE
303	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 512	YE
304	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 514	YE
305	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 515	YE
306	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 516	YE
307	*Ps. medicaginis*	MUSHIN, Stamm 517	YE
308	*Ps. syringae*	MUSHIN, Stamm 520	YE
309	*Ps. syringae*	MUSHIN, Stamm 524	YE
310	*Ps. syringae*	MUSHIN, Stamm 525	YE
311	*Ps. solanacearum*	BBA, Isolierung aus Kartoffel (Ägypten)	Di
312	*Ps. maculicola*	ATCC 11781	YE
313	*Ps. aceris*	ATCC 10853	YE
314	*Ps. solanacearum*	ATCC 10692	Di
315	*Ps. syringae*	ATCC 825	YE
316	*Ps. viridilivida*	ATCC 512	YE
317	*Ps. mangiferaeindicae*	ATCC 11637	D
318	*Ps. vitiswoodrowii*	ATCC 11636	D
319	*Ps. syringae*	ATCC 7432	YE
320	*Ps. solanacearum*	ATCC 9910	Di
321	*Ps. phaseolicola*	ATCC 11355	YE

[1]) Bei den Stämmen 297 bis 300 handelt es sich um Boden- oder Wasserisolierungen, die in bezug auf physiologische Eigenschaften mit bestimmten phytopathogenen Bakterien identisch sind. Die physiologischen Leistungen sind von RHODES (1959) näher untersucht worden.

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Kultur Nr.	Spezies	Herkunft	Nährboden
322	*Ps. caryophylli*	ATCC 11441	YE
323	*Ps. syringae*	ATCC 12271	YE
324	*Ps. syringae*	ATCC 12274	YE
325	*Ps. marginata*	ATCC 10248	YE
326	*Ps. marginalis*	ATCC 10858	YE
327	*Ps. asplenii*	ATCC 10855	YE
328	*Ps. woodsii*	ATCC 9655	YE
329	*Ps. stizolobii*	ATCC 12637	D
330	*Ps. lachrymans*	ATCC 7386	YE
331	*Ps. lachrymans*	ATCC 11921	YE
332	*Ps. pisi*	ATCC 11043	YE
333	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Zwetsche, Blatt, Heidelberg	YE
334	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Kirsche, Blatt, Heidelberg	YE
335	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Sauerkirsche, Blatt, Heidelberg	YE
336	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Birne, Frucht, Heidelberg	YE
337	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Birne, Zweig, Heidelberg	YE
338	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Wildkirsche	YE
339	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Erle, Blatt	YE
340	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Birne, Frucht, Karlsruhe	YE
341	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Walnuß, Blatt	YE
342	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Brennessel, Blatt	YE
343	*Ps.* sp.	BBA, Isoliert aus Flieder, latt	YE

Außer den vorstehend genannten Pseudomonaden wurden noch die folgenden, in der Bakteriensammlung des hiesigen Instituts vorhandenen Xanthomonas-Kulturen in die Untersuchung einbezogen:

606	*X. begoniae*	611	*X. phaseoli*
607	*X. campestris*	612	*X. pelargonii*
608	*X. hyacinthi*	613	*X. translucens*
609	*X. juglandis*	614	*X. pelargonii*
610	*X. malvacearum*	615	*X. uredovorus*

Anhang zur Tabelle 1

Die folgenden Bakterienstämme wurden zusätzlich auf Sensibilität gegenüber den vorhandenen *Pseudomonas*-Phagen geprüft:

Bacillus spp. (42 verschiedene Arten)
Agrobacterium tumefaciens (3 Stämme)
Agrobacterium radiobacter (2 Stämme)
B. radicicola (= *Rhizobium leguminosarum*) (3 Stämme)
Azotobacter indicum

Anhang zur Tablle 1 (Fortsetzung)

Azotobacter vinelandii
Azotobacter chroococcum
E. coli (Stamm B)
B. violaceum
B. prodigiosum
B. rubidaeum
Corynebact. michiganense
Corynebact. sepedonicum
Mycobact. eos
Mycobact. phlei
Micrococcus sp.
Sarcina sp.
Staphylococcus aureus, P 209
Proteus vulgaris
Proactinomyces coralleus
Proactinomyces flavus
Proactinomyces rubus
Azotomonas insolita
Erwinia amylovora
Erwinia carotovora (5 Stämme)
Salmonella typhimurium (LT 2)
Mycobact. sp.
Streptomyces griseus
Streptomyces chromogenes

fortlaufend, entsprechend den jeweiligen Zugängen. Infolgedessen erscheinen verschiedene Stämme der gleichen „Art" nicht immer als zusammengefaßte Gruppe.

3. Die bei den Untersuchungen verwendeten Bakteriophagen

a) Isolierung

Die Bakteriophagen wurden ebenso wie die fluoreszierenden Bakterien aus den verschiedenen Bodenproben isoliert. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

Von demjenigen Bakterienstamm, für den ein Phage isoliert werden soll, wird eine konzentrierte Zellsuspension hergestellt und in die nummernmäßig entsprechende Bodenprobe eingebracht (z. B. Bakterien des Stammes 4 in die Bodenprobe 4, aus der das Bakterium Nr. 4 ursprünglich isoliert worden ist). Nach Zusatz von Nährstoffen und durch gute Befeuchtung des Substrats wird bei 28 °C eine intensive Vermehrung des im Boden vorhandenen Mikrobengemisches in Gang gebracht. Sind zufällig Phagenpartikeln vorhanden, die für den eingeimpften Bakterienstamm lytische Aktivität besitzen, so wird infolge der hohen Konzentration sich vermehrender Zellen die Chance für ein „Zusammentreffen" von Phagen und Bakterienzellen erhöht. Unter diesen Verhältnissen kann damit gerechnet werden, daß sich die für den betreffenden Bakterienstamm aktiven Bakteriophagen durch Lysis sensibler Zellen stark anreichern. Nach einer Bebrütungszeit von zwei Tagen wird der feuchte Boden abzentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit werden einige Milliliter für eine weitere Anreicherung des (vermuteten) Phagen einer Reinkultur des entsprechenden Bakterienstammes, die sich in der frühen log-Entwicklungsphase befindet, zugesetzt. Diese Anreicherungskultur (Nährlösung Fl, 50 ml in Erlenmeyerkolben) wird bei einer Temperatur von 28 °C etwa 24 Stunden lang geschüttelt. Dann werden die Bakterien abzentrifugiert, und ein Teil der Lösung wird steril filtriert[1]).

Die Prüfung des bakterienfreien (sterilen) Filtrats auf Anwesenheit von Phagen erfolgte mit den in der Phagenforschung üblichen Methoden (vgl. ADAMS 1950). In den eigenen Untersuchungen wurde meist so vorgangen, daß zunächst einige Tropfen der Lösung auf einer Bakterienplatte (hergestellt nach der Doppelschichtmethode; siehe Punkt 4) getestet wurden. War eine lytische

[1]) Die Sterilfiltration wurde entweder mit Membranfiltern (Nr. 7 der Membranfiltergesellschaft Göttingen) oder mit Glasfiltern (G 5 auf G 3, Typ M oder F, Firma Schott, Mainz) durchgeführt.

Wirkung zu erkennen, dann wurden Verdünnungsstufen von der phagenhaltigen Lösung hergestellt und auf entsprechenden Testplatten Einzelplaques produziert.

b) Gewinnung konzentrierter Phagenlösungen

Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, daß ein diskreter Plaque (Phagenloch) die Nachkommenschaft eines einzelnen Phagenteilchens enthält, wurden von einem Einzelplaque ausgehend durch Verdünnung und Plattenguß erneut Einzelplaques hergestellt. Nach drei entsprechenden Passagen dienten die Phagenteilchen eines Einzelplaques als Ausgangsmaterial für die Gewinnung einer konzentrierten Phagenlösung. Das geschah in folgender Weise: Mit einer Bakteriensuspension (Zellen aus der log.-Phase, 0,5 ml, Konz. 10^8 bis 10^9 Bakt./ml) wurden 10 Petrischalen nach der Doppelschichtmethode (siehe Punkt 4) beimpft. Nach Festwerden der Oberschicht erhielt jede Platte einige Tropfen der phagenhaltigen Lösung, so daß sich auf dem heranwachsenden Bakterienrasen größere lytische Bezirke bzw. konfluierende Lysiszonen entwickeln konnten. Die lysierten Stellen wurden ausgestochen und in 25 ml Nährlösung A aufgeschwemmt. Nach Homogenisierung des phagenhaltigen Agars wurden die festen Bestandteile abzentrifugiert ($^1/_2$ Std. bei 3000 U/min) und die Lösung steril filtriert. Die Phagenkonzentration lag bei dieser Technik im allgemeinen zwischen 10^8 und 10^{10} Partikeln/ml.

c) Phagen-Wirt-Systeme

Insgesamt konnten für 52 Bodenfluoreszenten Phagen isoliert werden. Sie erhielten dieselben Nummern wie die korrespondierenden Bakterienstämme: Der Phage 40 gehört also zu dem Bakterienstamm 40, Phage 105 zu Stamm 105 usw. Im einzelnen handelt es sich um die folgenden Stämme: 4, 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 26, 27, 28, 31, 38, 39, 40, 45, 50, 51, 52, 58, 59, 68, 75, 83, 85, 87, 103, 105, 110, 111, 112, 116, 118, 125, 133, 136, 144, 146, 156, 158, 164, 167, 172, 174, 175, 176, 178, 183, 193, 197, 207. (Der Phage 207 wurde für den in der Institutssammlung vorhandenen Stamm von *Ps. fluorescens* — 207 — aus einer beliebigen Bodenprobe isoliert.)

Da sich die Phagen 20 u. 26, 26 u. 27, 26 u. 31, 27 u. 31, 39 u. 51, 58 u. 59, 75 u. 83 sowie 23 u. 207 auf Grund ihrer Aktivitätsspektren als identisch erwiesen, werden von diesen Phagen in Tabelle 2 nur 20, 39, 58, 75 und 207 berücksichtigt.

Um den Phagenbestand zu vergrößern, wurden nach der unter 3 a beschriebenen Anreicherungstechnik zusätzlich Phagen für einige phytopathogene *Pseudomonas*-„Arten" isoliert. Als Phagenquelle wurden zufällig entnommene Bodenproben des Dahlemer Versuchsfeldes eingesetzt. Mit großer Wahrscheinlichkeit hätten auch für andere *Ps.*-Kulturen aktive Phagen isoliert werden können. Da jedoch für die geplanten Untersuchungen inzwischen eine ausreichende Anzahl von Phagen-Wirt-Systemen zur Verfügung stand, wurde

auf weitere Isolierungen verzichtet. Im einzelnen wurden für folgende Kulturen Phagen isoliert:

Nr.	Bakterium Spezies	Phage
205	*Pseudomonas morsprunorum*	205
209	*Pseudomonas morsprunorum*	209
210	*Pseudomonas phaseolicola*	210
219	*Pseudomonas rimaefaciens*	219/1, 219/2, 219/3
220	*Pseudomonas intybi*	220/1, 220/2, 220/3
222	*Pseudomonas phaseolicola*	222
224	*Pseudomonas phaseolicola*	224
226	*Pseudomonas phaseolicola*	226
228	*Pseudomonas phaseolicola*	228
239	*Pseudomonas syringae*	239/1, 239/2
241	*Pseudomonas morsprunorum*	241

Während bei der Isolierung der für Bodenfluoreszenten aktiven Phagen jeweils nur ein Phagentyp (nach der Plaque-Morphologie) ausgewählt wurde, selbst wenn verschiedene Plaquetypen auftraten, wurden bei 219, 220 und 239 auch morphologisch verschiedene Plaquetypen berücksichtigt.

Schließlich wurden noch drei von KLEMENT (Budapest) isolierte *Pseudomonas*-Phagen mit in die Untersuchungen einbezogen. Es handelt sich um: 243/1 (= CaP_2 v. KLEMENT), 243/2 (= MoP_1) und 244 (= MhP_1).

4. Durchführung der Phagenteste

Nachdem die in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienkulturen und die unter 3 c genannten Bakteriophagen zur Verfügung standen, wurde die Aktivität jedes einzelnen Phagentyps bei allen Bakterienstämmen geprüft, um das Aktivitätsspektrum der Phagen bzw. das Sensibilitätsspektrum der Bakterien zu ermitteln.

Die Herstellung der Testplatten erfolgte nach der Doppelschichtmethode: Petrischalen wurden zunächst mit 15 ml Nähragar C (Agar-Konzentration 1,9 %) beschickt. Anschließend wurden 0,5 ml Bakteriensuspension (Konz. etwa 10^9 Zellen/ml) auf die Agaroberfläche aufgebracht und mit 3 bis 4 ml Nähragar A (Agar-Konzentration 0,8 %) vermischt. Bei guter Durchmischung von Nährsubstrat und Bakteriensuspension kommt es zur Ausbildung eines geschlossenen Bakterienrasens. Nach dem Festwerden und Erkalten der beimpften Oberschicht wurden an markierten Stellen Tropfen der zu testenden Phagenlösungen aufgesetzt (Volumen der Tropfen etwa 0,0005 ml). Da zu Beginn der Untersuchungen ausreichende Mengen der verschiedenen Phagenlösungen durch Vermehrung auf dem jeweils korrespondierenden (für die Isolierung benutzten) Bakterienstamm hergestellt worden waren, konnten sämtliche Aktivitätsprüfungen mit ein und derselben Testlösung durchgeführt werden. Im Durchschnitt enthielt ein aufgesetzter Tropfen 10^5 bis 10^7 Phagenpartikeln.

Nach 12 bis 24 Stunden wurde die Aktivität der Phagen (bzw. die Sensibilität der als Indikator eingesetzten Bakterien) an Hand des Auftretens oder des Fehlens einer lytischen Wirkung ermittelt. Wegen des umfangreichen Untersuchungsmaterials, das bei rund 350 Bak-

terien und 70 Phagen für alle Kombinationsmöglichkeiten etwa 25 000 Reaktionsteste erforderte, wurden auf einem Bakterienstamm (d. h. einer Testplatte) im allgemeinen 10 verschiedene Phagen gleichzeitig geprüft. Abbildung 1 a zeigt zwei entsprechende Testplatten, auf denen die Aktivität der jeweils gleichen Phagen bei zwei verschiedenen Bakterienstämmen zu erkennen ist. In Abbildung 1 b sind die von einzelnen Phagenteilchen hervorgerufenen „Plaques" abgebildet.

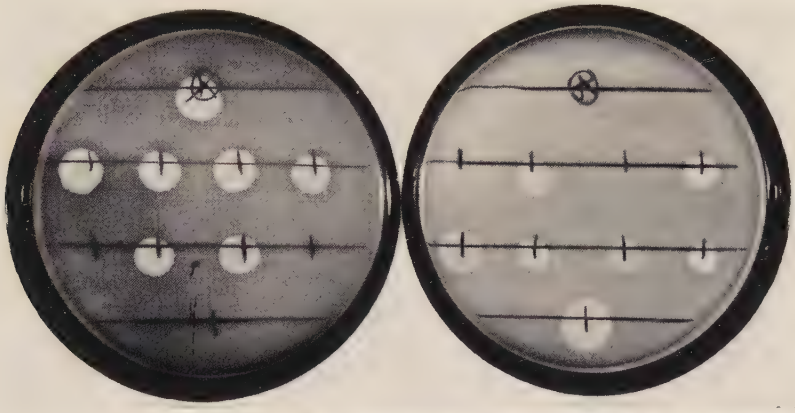


Abb. 1 a. Die Sensibilität von zwei *Pseudomonas*-Stämmen für 10 verschiedene Phagen.
Links: 144 (Bodenfluoreszent).
Rechts: 321 (*Ps. phaseolicola*).
Phagen(in den einzelnen Reihen von links nach rechts): 5, 87, 144, 167, 222, 224, 228, 239/1, 241, 244

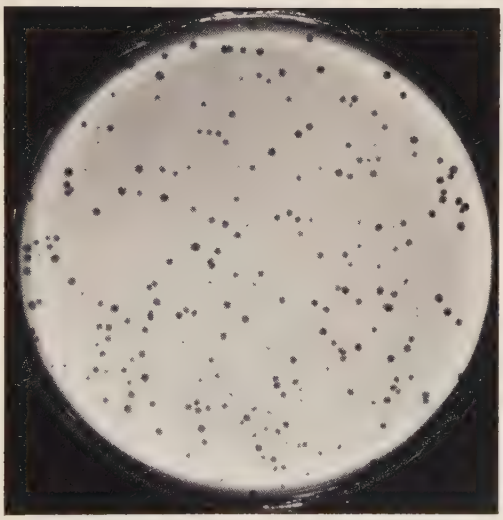


Abb. 1 b. Einzelplaques des Phagen 222 auf Stamm 144

Nach Abschluß des ersten Durchganges wurden die ermittelten Aktivitäten noch einmal in vereinfachter Form überprüft. Zu diesem Zweck wurden mehrere Phagen in einer Testlösung zusammengefaßt, so daß Gemische der konzentrierten Phagen-Stammlösungen zur Anwendung kamen. Insgesamt wurden 8 Phagengemische (die zusammen sämtliche Phagen enthielten) hergestellt. Diese konnten ohne Schwierigkeit auf einer Testplatte überprüft werden. Von derjenigen Lösung, die bei einem gegebenen Testbakterium lytische Aktivität zeigte, wurden anschließend die in der Lösung enthaltenen einzelnen Phagentypen durchgetestet. Auf diese Weise wurde ermittelt, welcher Phage (oder welche Phagen) der betreffenden Phagenmischung aktiv war. Bei negativer Reaktion eines mehrere Phagenstämme enthaltenden Gemisches erübrigten sich die sonst erforderlichen individuellen Teste mit den einzelnen Phagenstämmen. Darin lag die Arbeitsersparnis.

Traten auf einer Testplatte Reaktionen auf, die nicht eindeutig das Vorliegen einer durch Phagen verursachten Bakterienlysis erkennen ließen (gelegentlich konnten antagonistische Wirkungen eines Bakterienlysats festgestellt werden), dann wurde das entsprechende Phagen-Wirt-System getrennt analysiert (durch Prüfung von Phagenverdünnungen auf die Fähigkeit, Einzelplaques hervorzurufen; vgl. Abb. 1 b).

Abschließend mag noch darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den benutzten Phagen ausnahmslos um lytische (oder virulente) Phagen gehandelt hat, die im Gegensatz zu den sogenannten temperenten Phagen (engl. temperate phages) nicht dazu befähigt sind, Zellen eines sensiblen Bakterienstammes (das sogenannte Indikatorbakterium) zu lysogenisieren[1])

5. Pathogenitätsteste

Zur Überprüfung von bestimmten Schlußfolgerungen, die aus dem Ergebnis der Phagenteste gezogen wurden, war die Durchführung einer Reihe von Pathogenitätstesten an Pflanzen erforderlich. Da die Infektionstechnik für das Zustandekommen eines pathogenen Effekts von entscheidender Bedeutung ist und in den durchgeführten Versuchen verschiedene Infektionsmethoden zur Anwendung kamen, werden technische Einzelheiten bei der Besprechung der jeweiligen Versuchsanstellung mitgeteilt.

ERGEBNISSE

I. Phagenteste

In Tabelle 2 ist das Ergebnis sämtlicher Phagenteste zusammengestellt worden. Um Platz zu sparen, wurden diejenigen Bakterienstämme aus Tabelle 1, die mit keinem der vorhandenen Phagen reagierten (sich also resistent verhielten), nicht mit aufgeführt. Obwohl auf den ersten Blick aus dieser Übersicht nicht viel zu entnehmen ist, treten bei näherer Betrachtung folgende Beziehungen deutlich in Erscheinung:

1. Ein gegebener Phage besitzt nicht nur lytische Aktivität für denjenigen Bakterienstamm, der zu seiner Isolierung eingesetzt worden ist, sondern auch für eine mehr oder weniger große Anzahl anderer Bakterienstämme. Da es sich bei einem Teil der in gleicher Weise phagenanfälligen Kulturen um verschiedene „Arten" handelt, ist die Phagenaktivität — auf die Systematik bezogen — im allgemeinen „Arten"-unspezifisch.

2. Ein gegebenes Bakterium wird in den meisten Fällen nicht nur von einem Phagenstamm, sondern auch von einer mehr oder weniger großen Anzahl anderer Phagenstämme lysiert.

3. Phagen, die ursprünglich für Bodenfluoreszenten isoliert worden sind (Nr. unter 200), lysieren neben dem homologen Stamm nicht nur andere Bodenfluoreszenten, sondern auch phytopathogene *Pseudomonas*-„Arten". Andererseits besitzen diejenigen Phagen, die ursprünglich für pathogene Bakterien isoliert worden sind, auch lytische Aktivität für Bodenfluoreszenten.

[1]) Über virulente und temperente Bakteriophagen siehe LURIA (1953) und LWOFF (1953).

Tabelle 2

Die Phagenspektren der untersuchten Bakterienstämme

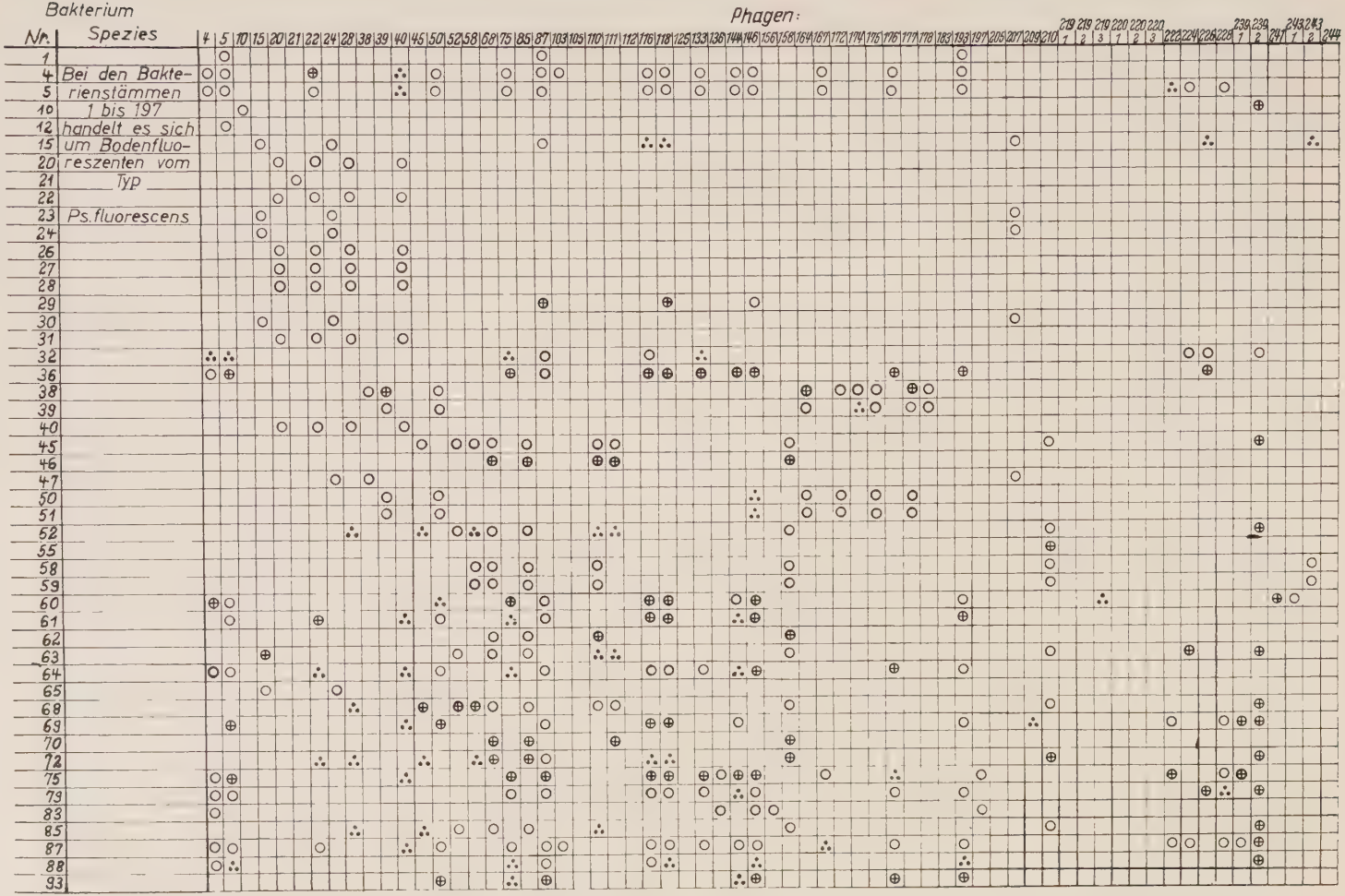


Tabelle 2 (Fortsetzung)

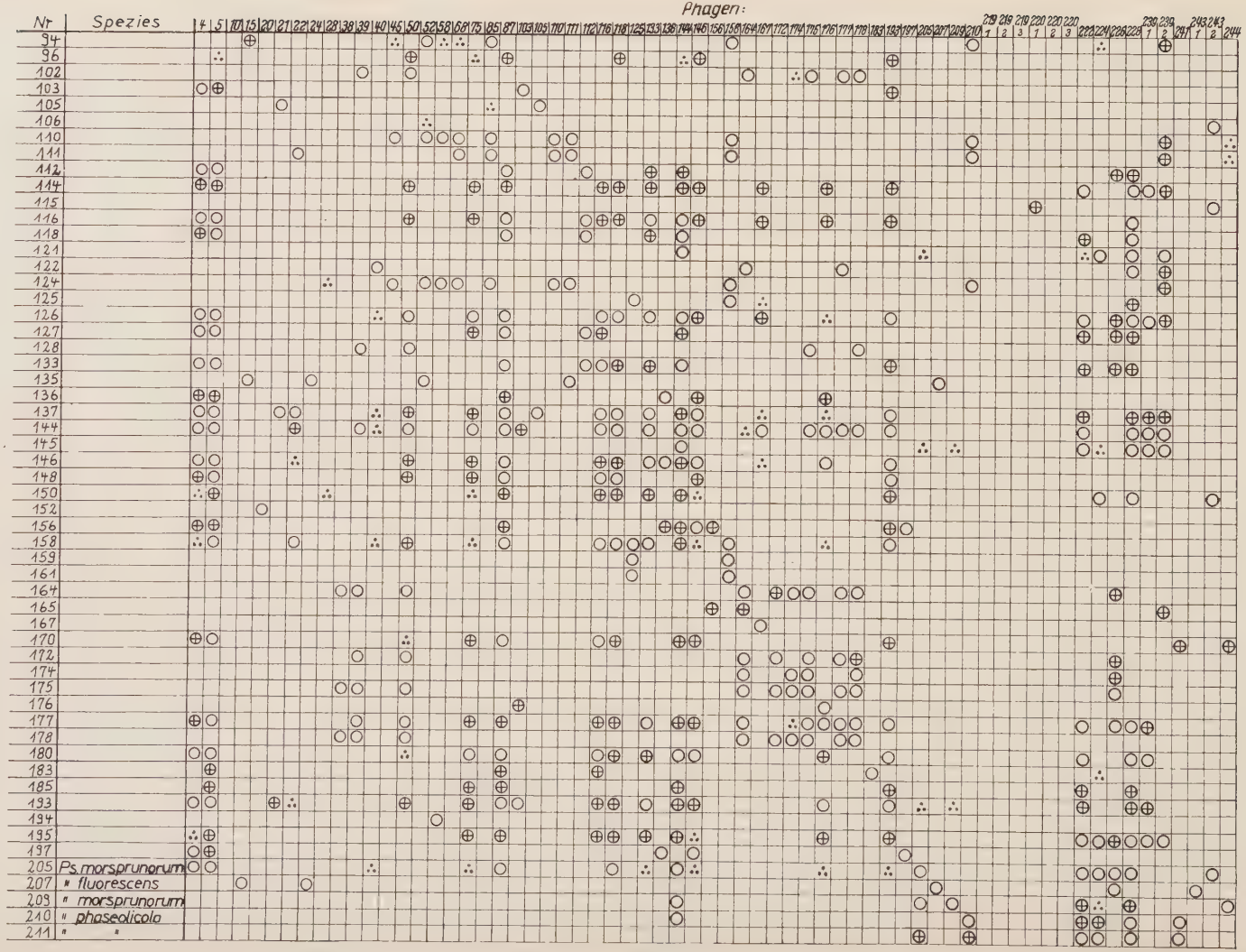


Tabelle 2 (Fortsetzung)

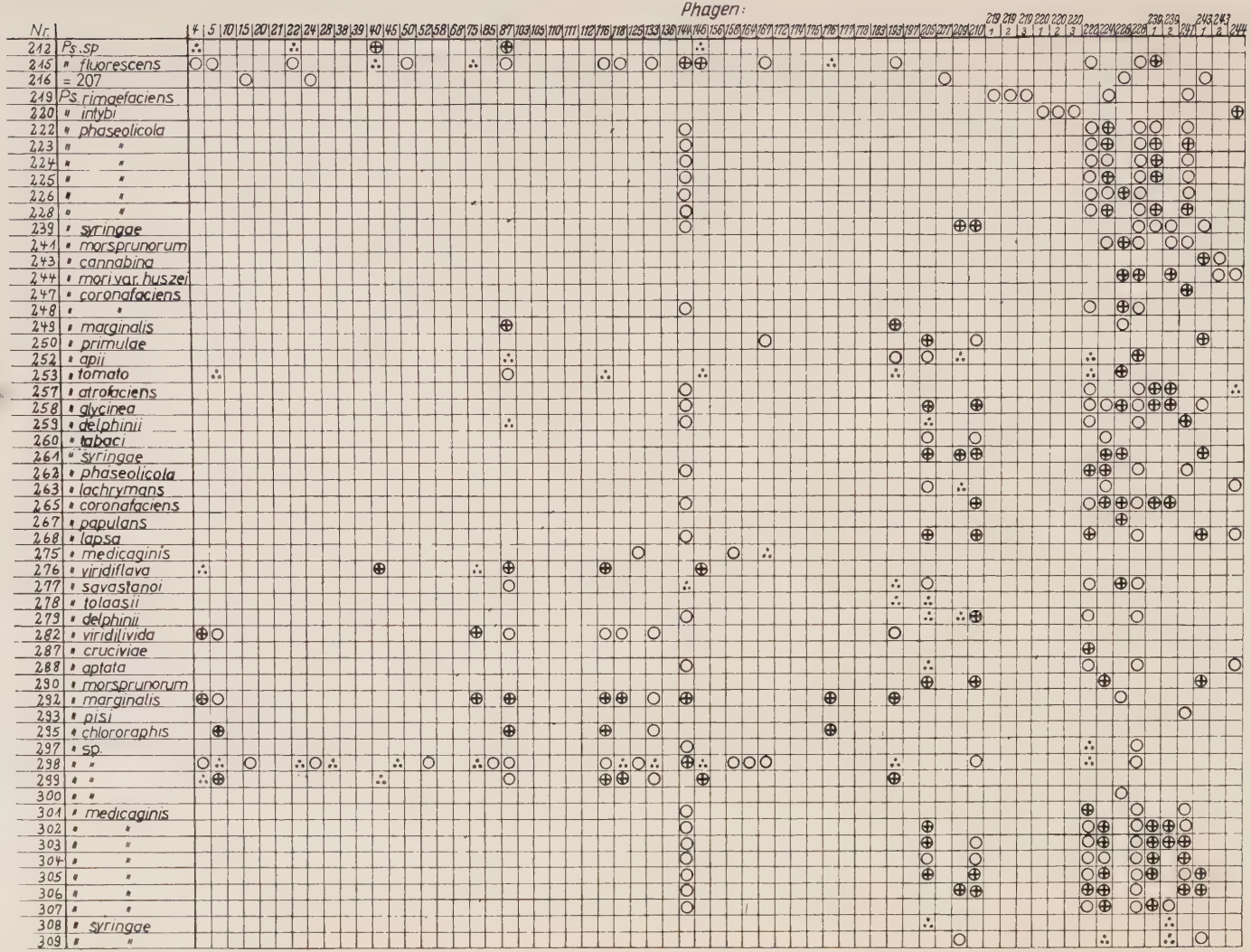
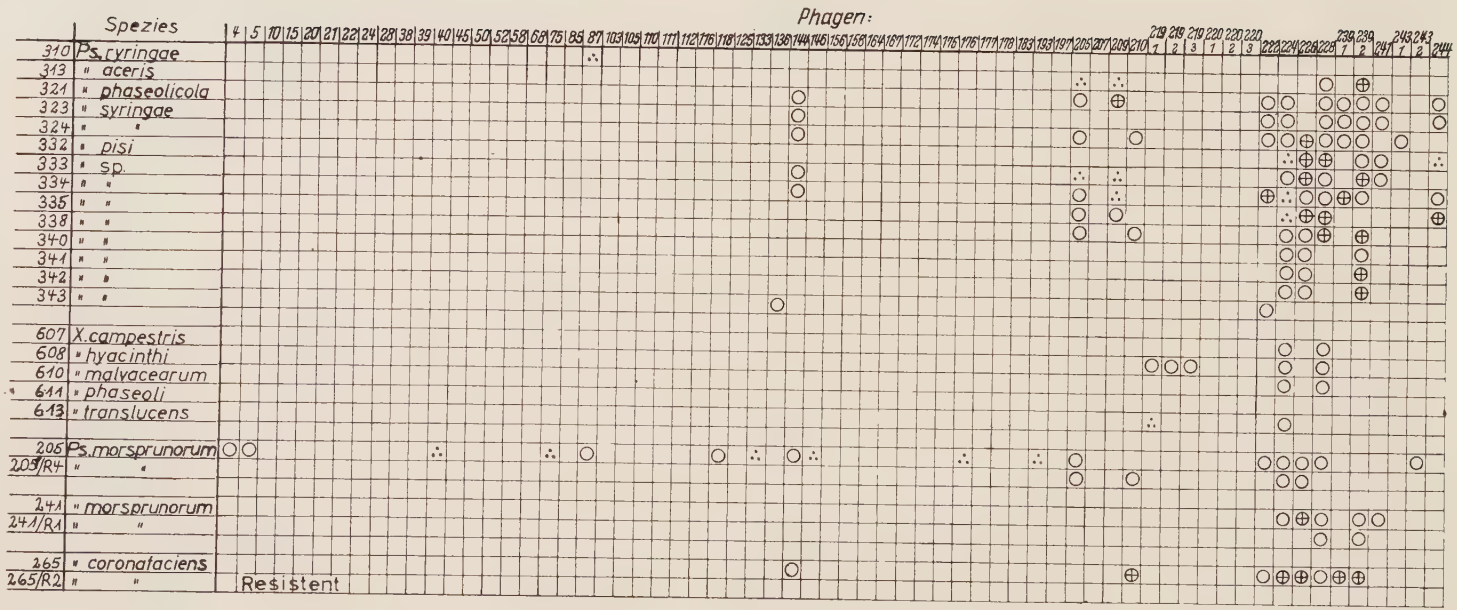


Tabelle 2 (Fortsetzung)



Zeichenerklärung: ○ = scharf begrenzte und klare Lysis
⊕ = lysierte Zone mit Restwachstum
∴ = Einzelplaques im Bereich des Phagentropfens

4. Die Reaktion zwischen Phage und Wirt zeigt bei der Art der angewandten Technik (Tropfentest mit etwa 10^5 bis 10^7 Phagenteilchen) verschiedene Reaktionsbilder (siehe Tab. 2):

a) Eine scharf begrenzte und komplette Lysis,

b) eine lysierte Zone mit Restwachstum (engl. residual growth),

c) das Auftreten von einzelnen Plaques im Bereich des aufgesetzten Phagentropfens (durch Wirtsbereichmutanten) oder

d) ungehindertes Bakterienwachstum, wenn eine lytische Aktivität für das betreffende Bakterium nicht vorliegt.

Dabei ist zu berücksichtigen, daß Tropfen einer bestimmten Phagenlösung (gleicher Konzentration) bei einem Bakterium nach a), bei anderen Bakterien nach b), c) oder d) reagieren können.

Die Phagenteste wurden bewußt mit konzentrierten Phagensuspensionen durchgeführt, um gegebenenfalls vorhandene Wirtsbereichmutanten (engl. host-range mutants) zur Wirkung kommen zu lassen. Auf diese Weise konnte das Netz der Beziehungen zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen noch verdichtet werden. Bei der Lysotypie (vgl. S. 239) wird im Gegensatz zu dieser Technik aus bestimmten Gründen mit einer Minimalkonzentration gearbeitet (der sogenannten RTD = routine test dilution, d. h. der geringsten Phagenkonzentration, die auf dem homologen Stamm noch konfluierende Lysis hervorruft).

5. Es ist auffallend, daß bei Bakterienkulturen verschiedener Herkunft völlig identische Phagen-Reaktionsspektren nur relativ selten auftreten. Die Identität in der Phagensensibilität, wie sie bei einigen Bodenisolierungen vorliegt (Beispiele: 20, 22, 26, 27, 28 und 31 oder 23, 24 und 30) hängt vermutlich damit zusammen, daß in räumlich nicht weit voneinander entfernten Arealen ein bestimmter *Pseudomonas*-Lysotyp dominiert. Verschiedene für die Isolierung der Fluoreszenten benutzte Bodenproben (mit nahe beieinander liegenden Probenummern) waren nämlich vielfach von ein und demselben Feld mit nur wenigen Metern Abstand entnommen worden.

Die Beurteilung der Bakterienidentität nach dem Merkmal der gemeinsamen Phagensensibilität hängt im übrigen von der Anzahl der eingesetzten Phagen ab. Bei Untersuchungen mit nur einem oder einigen wenigen Phagen zeigen naturgemäß mehr Kulturen ein „identisches" Sensibilitätsspektrum. Die „Identität" kann aber immer nur auf das benutzte Phagenmaterial bezogen werden. Je mehr Phagen in einer Untersuchung eingesetzt werden, um so größer wird die Wahrscheinlichkeit, daß bei den geprüften Bakterienkulturen Unterschiede in der Phagensensibilität aufgedeckt werden. In der Verschiedenheit der Phagenspektren kommt die Individualität der untersuchten Bakterienpopulationen zum Ausdruck. Darauf wird in der Diskussion noch zurückzukommen sein.

6. Trotz vorhandener Unterschiede hinsichtlich der Reaktion mit dem einen oder anderen Phagen lassen sich aus dem Gesamtmaterial der Bakterien Gruppen aufstellen, in denen Stämme mit ähnlichen Phagensensibilitätsspek-

tren zusammengefaßt werden. Die unter diesem Gesichtspunkt erfolgte Anordnung in Tabelle 3 läßt erkennen, daß sowohl verschiedene phytopathogene *Pseudomonas*-„Arten" als auch bestimmte, zufällig isolierte Bodenfluoreszenten ähnliche Sensibilitätsspektren aufweisen. Für die in Tabelle 3 aufgeführten „phagenmäßig" mehr oder weniger gut übereinstimmenden „Arten" wird der Wirtspflanzenkreis von ELLIOTT (1951) wie folgt angegeben:

Ps. phaseolicola	*Phaseolus coccineus, Ph. lunatus macrocarpus, Ph. vulgaris, Pueraria thunbergiana*
Ps. medicaginis	*Medicago sativa*
Ps. coronafaciens	*Avena sativa, Hordeum vulgare, Secale cereale, Triticum aestivum*
Ps. atrofaciens	*Triticum aestivum, Hordeum vulgare, Solanum tuberosum, Lycopersicum esculentum*
Ps. delphinii	*Delphinium* spp., *Aconitum napellus*
Ps. glycinea	*Soja max*
Ps. syringae	etwa 80 Pflanzenarten, u. a. *Citrus* spp., *Hibiscus* spp., *Juglans regia, Lactuca sativa, Lycopersicum esculentum, Medicago sativa, Musa paradisiaca, Phaseolus* spp., *Prunus* spp., *Syringa* spp., *Trifolium* spp., *Vicia faba, Zea Mays*
Ps. lapsa	*Zea Mays, Saccharum officinarum*
Ps. aptata	*Beta vulgaris, Capsicum annuum, Lactuca sativa, Phaseolus vulgaris, Solanum melongena, Tropaeolum majus*
Ps. viridilivida	*Lactuca sativa, Lycopersicum esculentum*
Ps. marginalis	*Lactuca sativa, Solanum tuberosum, Lycopersicum esculentum, Daucus carota, Cichorium endivia, C. intybis*
Ps. morsprunorum	*Prunus* spp.
Ps. savastanoi	*Olea* spp., *Chionanthus virginica, Forestiera acuminata, F. neomexicana, Forsythia* spp., *Fraxinus* spp., *Jasminum primulinum, Osmanthus*
Ps. tabaci	*Nicotiana* spp., *Lycopersicum esculentum, Vigna sinensis, Soja max* und zahlreiche andere Pflanzen
Ps. lachrymans	*Bryomopsis laciniosa, Cucumis* spp., *Cucurbita* spp., *Lagenaria leucantha, Luffa acutangula*
Ps. cannabina[1])	*Cannabis* spp.
Ps. rimaefaciens	*Populus* spp.
Ps. mori var. *huszei*[1])	*Morus* spp.
Ps. pisi	*Dolichus lablab, Lathyrus* spp., *Pisum* spp., *Vigna* spp., *Vicia atropurpurea*
Ps. papulans	*Malus sylvestris, Magnolia soulangeana*

Die Zusammenstellung zeigt, daß für die „phagenmäßig" verwandten „Arten" sehr verschiedene Wirtsbereiche angegeben werden. Die in Tabelle 3 angeführten Beispiele könnten durch andere Kulturen des untersuchten Bakterienmaterials noch erweitert werden, doch dürften die genannten Fälle genügen, um das Wesentliche, nämlich die Zusammengehörigkeit verschiedener *Pseudomonas*-„Arten" unter dem Gesichtspunkt ähnlicher Phagensensibilität, zu erkennen.

7. Aus Tabelle 2 kann des weiteren entnommen werden, daß verschiedene Isolierungen (Stämme) einer bestimmten *Pseudomonas*-„Art" unterschiedliche Phagenspektren aufweisen. Um eine bessere Übersicht zu haben, sind in

[1]) Siehe Anmerkung in Tabelle 7.

Tabelle 3

Verschiedene *Pseudomonas*-„Arten" und saprophytische Fluoreszenten mit ähnlichen Phagen-Sensibilitätsspektren

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 2

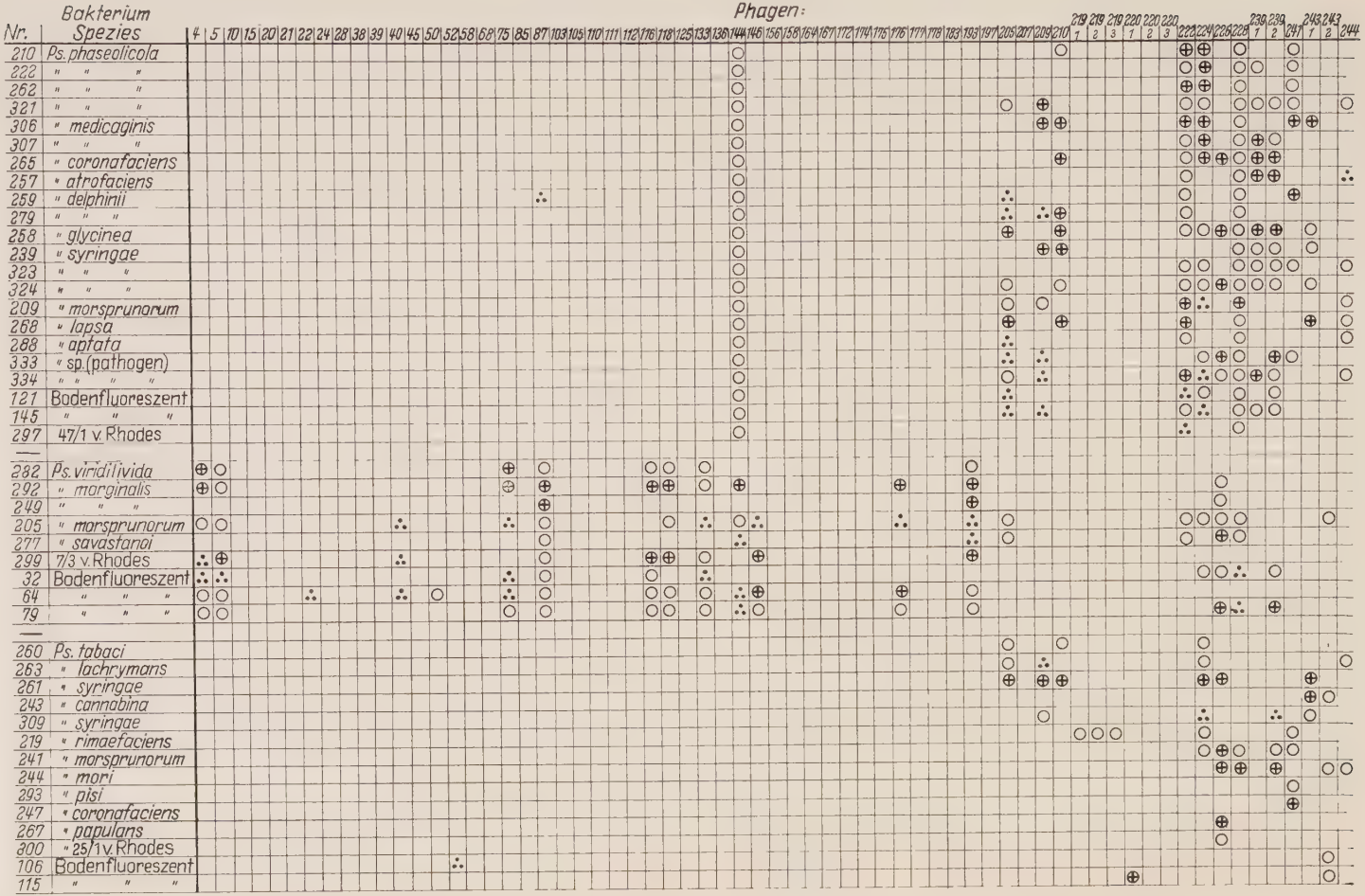


Tabelle 4

Phagen-Sensibilitätsspektren bei verschiedenen Stämmen gleicher „Art"-Zugehörigkeit

Zeichenerklärung: siehe Tabelle 2

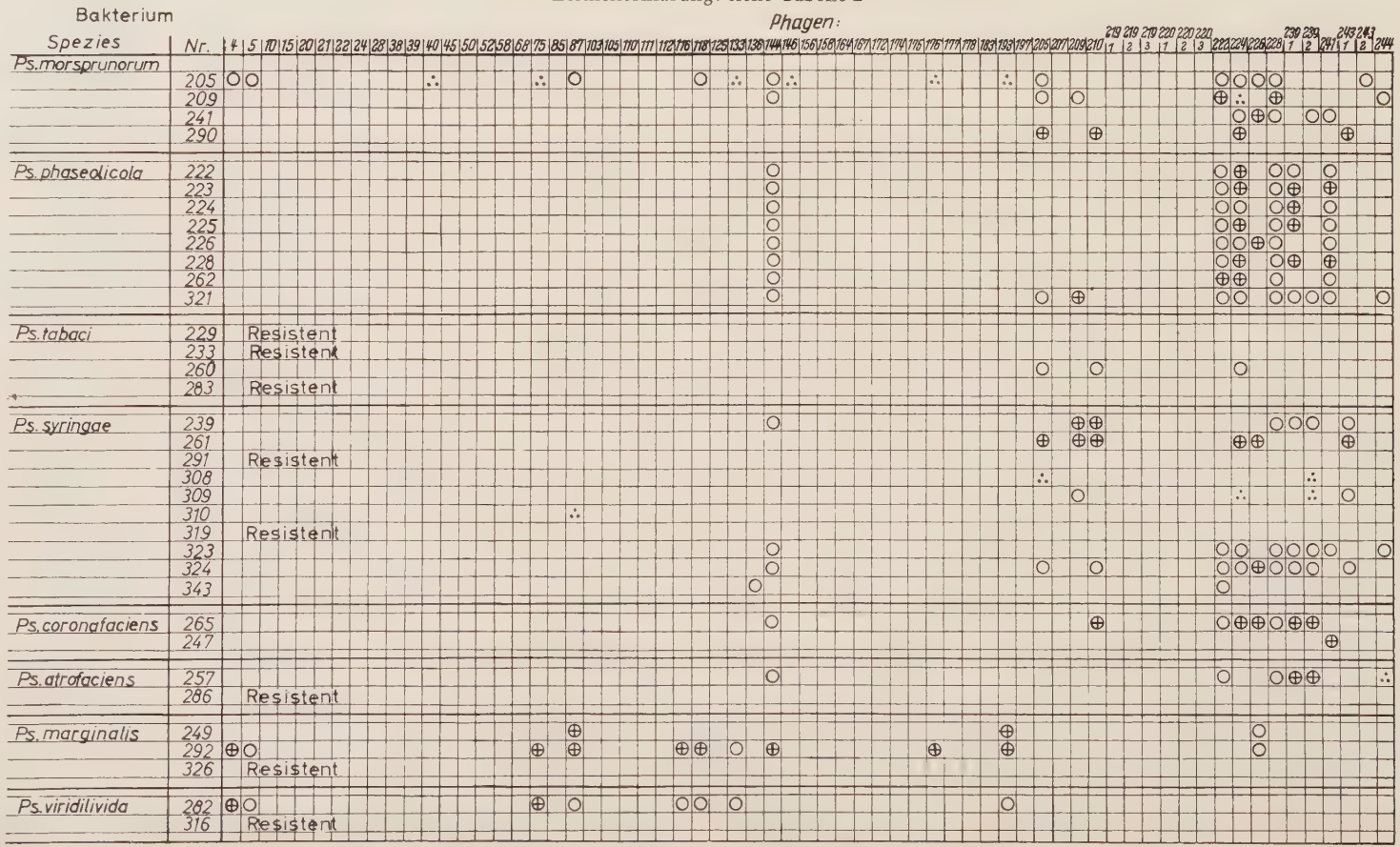


Tabelle 4 einige Beispiele zusammengestellt worden. Die identische Phagensensibilität bei den *Ps. phaseolicola*-Kulturen 222, 223, 224, 225 und 228 hängt damit zusammen, daß es sich bei 222, 223, 224, 225 um Reisolierungen ein und desselben Bakterienstammes (228) handelt. Die Kulturen sind gemeinsamen Ursprungs und gehören aus diesem Grunde dem gleichen Lysotyp an. Ganz allgemein kann gesagt werden, daß die Impfpassagen (Subkulturen) eines bestimmten Stammes in ihrem Phagen-Lysotyp übereinstimmen. Die in einer Bakterienpopulation auftretenden Mutanten mit veränderter Phagensensibilität (für Resistenz-Mutation siehe Luria u. Delbrück 1943, für Sensibilitäts-Mutation siehe Stolp 1958) sind wegen der niedrigen Mutationsrate (etwa 10^{-8} bis 10^{-10} je Zelle und Zellgeneration) bei dieser Betrachtung zu vernachlässigen. Würde sich die Phagensensibilität einer bestimmten Kultur (d. h. die gesamte Population) von einer Passage zur anderen ändern, dann wäre der Lysotypie, auf die einleitend hingewiesen wurde, jede Grundlage entzogen, und auch die vorliegenden Untersuchungen hätten wenig Sinn gehabt. Die bisherigen Erfahrungen sprechen jedoch gegen eine Änderung und für die Konstanz[1]) des Phagensensibilitätsspektrums einer Bakterienkultur, solange ihre Vermehrung im Sinne gewöhnlicher Überimpfungen erfolgt. In den eigenen Untersuchungen konnte jedenfalls bei keinem der Stämme eine Änderung des Lysotyps beobachtet werden.

8. Ein Teil der Bakterienstämme (sowohl der phytopathogenen „Arten" als auch der Bodenfluoreszenten) wird von keinem der in die Untersuchung einbezogenen Phagen lysiert (diese Stämme wurden in Tabelle 2 nicht mit aufgenommen). Das besagt jedoch nicht, daß diese Bakterien als absolut phagenresistent gelten müssen. Erfahrungsgemäß gelingt es in darauf abgestellten Versuchen, auch für solche Bakterienstämme Phagen zu isolieren.

9. Aus den Angaben der Tabelle 2 geht außerdem hervor, daß einige *Pseudomonas*-Phagen auch für phytopathogene „Arten" der Gattung *Xanthomonas* lytische Aktivität besitzen. Diese extreme „Unspezifität" könnte den Gedanken nahelegen, daß aus der gemeinsamen Phagensensibilität von Bakterien überhaupt keine Rückschlüsse auf ihre verwandtschaftlichen Beziehungen gezogen werden können[2]). Voraussetzung für diese Argumentation wäre

[1]) Die Konstanz ergibt sich aus dem Verhalten der überwiegenden Mehrheit der eine Kultur (Population) bildenden Individuen. Unter bestimmten Bedingungen (z. B. in Gegenwart aktiver Phagen) können sich jedoch phagenresistente Mutanten selektiv entwickeln und damit den Reaktionstyp der Kultur ändern. Bakterien mit unterschiedlicher Phagensensibilität können also durchaus in direkter Linie miteinander verwandt sein. Daraus geht hervor, daß der negative Ausfall eines Sensibilitätstestes (die Resistenz) die Möglichkeit der Verwandtschaft zu sensiblen Stämmen (bezogen auf den gleichen Phagen) nicht grundsätzlich ausschließt.

[2]) Es mag in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß auch serologische Reaktionen den gleichen Grad der „Unspezifität" erreichen. So ist z. B. der Stamm 610 (*X. malvacearum*), eine typische, gelben Farbstoff bildende *Xanthomonas*-Kultur, mit der grün-fluoreszierenden Bodenisolierung 145 serologisch nahe verwandt (unveröffentlichtes Ergebnis). 610 und 145 werden von dem Phagen 228 (ursprünglich isoliert für *Ps. phaseolicola*) lysiert (s. Tab. 2).

allerdings, daß man die gegenwärtige Einteilung der phytopathogenen Bakterien im System als richtig anerkennt.

Um festzustellen, ob die „Unspezifität" der eingesetzten *Pseudomonas*-Phagen auch noch über die „Arten" der Gattungen *Pseudomonas* und *Xanthomonas* hinausgeht, wurden zusätzlich Bakterien von verschiedenster systematischer Stellung überprüft. Zur Vereinfachung des Testverfahrens wurde ein Gemisch aus allen vorhandenen *Pseudomonas*-Phagen benutzt. Das Ergebnis zeigte eindeutig, daß die lytische Aktivität der verwendeten Phagen auf Pseudomonaden und Xanthomonaden beschränkt ist. Der Phagentest verlief negativ bei allen untersuchten, im Anhang zur Tabelle 1 aufgeführten Bakterienstämmen.

10. Erwähnenswert ist schließlich noch folgende Feststellung: Typische Gefäßparasiten wie *Ps. solanacearum* (270, 311, 314, 320) und *Ps. caryophylli* (245, 246, 271, 322) werden von keinem der vorhandenen *Pseudomonas*-Phagen lysiert. Offensichtlich passen diese Bakterien nicht in den Formenkreis der Fluoreszenten.

Aus den Phagenreaktionstesten geht hervor, daß Bodenisolierungen vom Typ *Ps. fluorescens* und bestimmte phytopathogene „Arten" der Gattung *Pseudomonas* (und *Xanthomonas*) „phagenmäßig" zusammengehören. Die Zusammengehörigkeit dieser Bakterien ist an sich nicht überraschend und besagt auch nichts Neues, denn sie werden schon seit langem, wenn auch auf Grund anderer Gemeinsamkeiten, in einer Familie des Bakteriensystems (*Pseudomonadaceae*) zusammengefaßt. Insofern sind die Ergebnisse der Phagenteste nur eine Bestätigung dafür, daß es sich bei den Pseudomonaden und Xanthomonaden um nahe verwandte Formen handelt. Dessen ungeachtet bleibt aber die einleitend gestellte Frage offen, ob die „Arten"-Einteilung innerhalb der Gattung *Pseudomonas* gerechtfertigt ist.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß für die Abgrenzung der phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" wegen des Mangels an morphologischen und physiologischen Unterschieden der „spezifischen" Pathogenität der verschiedenen Erreger besondere Bedeutung zukommt. Von der Überlegung ausgehend, daß solche Bakterien, die von einem oder mehreren Bakteriophagen gemeinsam lysiert werden, auf Grund ihres ähnlichen Gengefüges (siehe Diskussion) zu denselben Leistungen befähigt sein könnten, wurden Versuche zur Überprüfung der den verschiedenen *Pseudomonas*-„Arten" zugesprochenen „spezifischen Pathogenität" durchgeführt.

II. Pathogenitätsteste

Die Abgrenzung der phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" — das darf gleich noch einmal wiederholt werden — beruht im wesentlichen auf der Vorstellung (nicht dem Beweis!), daß von bestimmten „Arten" nur ganz bestimmte Pflanzen (oder ein definierter Wirtspflanzenkreis) befallen werden. Um nachzuprüfen, ob diese Annahme den tatsächlichen Verhältnissen entspricht, kann man experimentell zwei verschiedene Wege gehen:

a) Man prüft die Pathogenität einer Bakterien-„Art" bei vielen verschiedenen Pflanzenarten. Dann dürften nur die für das betreffende Bakterium als anfällig angegebenen Wirtspflanzen erkranken.

b) Man prüft die Pathogenität vieler Bakterien-„Arten" auf einer Testpflanze. In diesem Falle dürfte nur der für die betreffende Pflanze „spezifische" Erreger (bzw. die für diese Pflanze als pathogen angesehenen Erreger-„Arten") Krankheitssymptome hervorrufen. Da der zweite Weg arbeitstechnisch einfacher ist, wurden die Versuche vor allem in dieser Richtung durchgeführt.

1. Allgemeines zum Problem der künstlichen Infektion

Vorweg sei eine banal erscheinende Feststellung erlaubt: Wenn die Pathogenität eines Bakteriums überprüft werden soll, dann müssen die betreffenden Bakterien in „geeigneter" Form mit der gesunden Pflanze zusammengebracht werden. Handelt es sich um einen Gefäßparasiten, so muß die Infektion im Gefäßteil erfolgen, verursacht der Erreger Blattnekrosen, so ist eine „Beimpfung" der Blätter erforderlich. Da es sich bei den zur Diskussion stehenden Pseudomonaden vornehmlich um Blattparasiten handelt, sollen einige allgemeine Ausführungen zum Problem der künstlichen Blattinfektion vorausgeschickt werden.

Zunächst einmal ist anzustreben, daß die künstliche Infektion dem natürlichen Infektionsvorgang möglichst nahe kommt. Aus diesem Grunde wurde von vornherein auf die vielfach angewandte Technik der Stichinfektion (mit Verletzung des Blattgewebes) verzichtet. Es ist jedem Phytopathologen bekannt, daß das „Angehen" einer Bakterieninfektion nicht allein von der Anwesenheit des pathogenen Erregers abhängt. Diese Tatsache läßt sich in einfacher Weise demonstrieren. Abbildung 2 zeigt drei Bohnenpflanzen, die in gleicher Weise mit der Suspension eines für Bohnen pathogenen Bakteriums besprüht worden sind. Aber nur die Blätter der rechten Pflanze sind erkrankt; die beiden anderen Pflanzen sind absolut gesund geblieben. Das unterschiedliche Verhalten ist nicht auf eine verschiedenartige Beimpfung zurückzuführen, sondern liegt allein an der Vorbehandlung der Pflanzen. Wenn in trockener Luft (links, relative Feuchte 60 %) oder selbst in dampfgesättigter Atmosphäre (Mitte, relative Feuchte 100 %) gehaltene Gewächshauspflanzen mit Bakterien besprüht und anschließend bei 100%iger Luftfeuchte kultiviert werden, dann passiert im allgemeinen gar nichts. Werden sie jedoch vor der Beimpfung ganz oder teilweise mit Wasser infiltriert (Technik siehe weiter unten), dann treten Krankheitssymptome auf (rechte Pflanze; vor der Beimpfung wurden die Blätter infiltriert, nach der Beimpfung ebenfalls in 100%iger Luftfeuchte gehalten). Infiltrierte Kontrollpflanzen (nicht beimpft) bleiben unter sonst gleichen Bedingungen ungeschädigt. Aus diesem einfachen Versuch geht hervor, daß über das Zustandekommen eines pathogenen Effektes nicht allein die (externe) Anwesenheit des Erregers entscheidet. Offensichtlich ist für das Eindringen der von außen an die Pflanze herangetragenen (aufgesprühten) Bakterien die Ausbildung eines geschlossenen

Abb. 2. Drei mit der gleichen Bakteriensuspension (Stamm 205) besprühte Bohnenpflanzen (siehe Text)

Wasserfilmes von der Blattoberfläche über die Spaltöffnungen in die Interzellularräume erforderlich[1]).

Daß aber nicht jedes beliebige Bakterium bei Anwendung der Infiltrationstechnik Krankheitssymptome verursacht, beweist ein Versuch, der in Abbildung 3 wiedergegeben ist. Es handelt sich hier um folgendes Experiment: 2 *Pelargonium*-Pflanzen wurden mit Wasser infiltriert und auf der Unterseite der wasserdurchtränkten Blätter mit einigen Tropfen Bakteriensuspension beimpft (Konz. etwa 10^7 Bakt./ml). Die Pflanzen blieben so lange in trockner Luft, bis ein Teil des infiltrierten Wassers verdampft und die aufgebrachte Bakteriensuspension in das Blattinnere eingesogen war. Dann wurden sie für zwei Tage in eine Gewächshauskabine mit 100%iger rel. Luftfeuchte gestellt (bei 25 °C) und anschließend bei normaler Feuchte (etwa 60 %) gehalten. Die Beimpfung der einzelnen Blätter einer Pflanze erfolgte mit verschiedenen Bakterien-„Arten". Nach vier Tagen wurden die Blätter abgenommen, um die aufgetretenen Symptome im Bild festhalten zu können. In der oberen Reihe (Abbildung 3, Blätter der ersten Pflanze) handelt es sich um die Wirkung folgender Bakterien (von links nach rechts): *Bac. megaterium*, *X. campestris* (607),*Ps. delphinii* (279) und *Ps. lapsa* (268). In der unteren Reihe (Blätter der zweiten Pflanze) um: *Bact. prodigiosum*, *X.pelargonii* (612) und *Ps. morsprunorum* (205). Die unterschiedliche Blattgröße ist durch die Versuchsanstellung bedingt (Beimpfung verschiedener Blätter bei einer Pflanze) und ist für das Zustandekommen des pathogenen Effekts ohne Bedeutung.

Es kann aus diesem Versuch zweierlei entnommen werden:

[1]) Im Zusammenhang mit dem Problem der Entstehung primärer Infektionsherde werden diese Vorgänge in einer folgenden Veröffentlichung ausführlicher behandelt.

1. *Bac. megaterium* und *Bact. prodigiosum* rufen — wie zu erwarten ist — keine Krankheitssymptome hervor.

2. Nicht nur von *X. pelargonii*, sondern auch von *X. campestris*, *Ps. delphinii*, *Ps. lapsa* und *Ps. morsprunorum* werden Blattnekrosen hervorgerufen, obwohl diese „Arten" als Krankheitserreger von ganz anderen Wirtspflanzen angesehen werden. *X. campestris* soll vor allem für *Brassica*-Arten, *Ps. delphinii* ausschließlich für *Delphinium* und *Aconitum*, *Ps. lapsa* für Mais und Zuckerrohr und *Ps. morsprunorum* für *Prunus*-Arten pathogen sein.

Es mag noch darauf hingewiesen werden, daß die von den verschiedenen Erregern an den einzelnen *Pelargonium*-Blättern ausgebildeten Symptome keine Unterschiede erkennen lassen. Die pathogene Potenz der geprüften (zufällig ausgewählten) Bakterien-„Arten" muß folglich — zumindest für Pelargonien — als gleichwertig betrachtet werden. Wenn man diese Tatsache akzeptiert, dann gibt es zwei Möglichkeiten, aus dem offensichtlich vorhandenen Widerspruch zwischen den für die Erreger angegebenen und den im Experiment gefundenen pathogenen Potenzen herauszukommen:

1. Man sagt, der Wirtspflanzenkreis der geprüften Erreger war bislang nur ungenügend bekannt, und es muß in Zukunft berücksichtigt werden, daß auch *Ps. delphinii*, *Ps. lapsa* usw. für *Pelargonium* pathogene Eigenschaften besitzen.

2. Man bezweifelt die Realität der verschiedenen „Arten" und der ihnen zugeordneten pathogenen Potenzen.

Abb. 3. Mit verschiedenen Bakterien-„Arten" beimpfte *Pelargonium*-Blätter (siehe Text)
Obere Reihe (von links nach rechts): *Bac. megaterium* — *X. campestris* (607) — *Ps. delphinii* (279) — *Ps. lapsa* (268)
Untere Reihe (von links nach rechts): *Bact. prodigiosum* — *X. pelargonii* (612) — *Ps. morsprunorum* (205)

Um die zweite Erklärungsmöglichkeit an einem größeren Material zu überprüfen, wurden umfangreiche Infektionsversuche durchgeführt, über die im folgenden berichtet wird.

2. Die angewandte Impftechnik

Grundlage aller Infektionsversuche war die Infiltrationstechnik.

In einem Exsikkator wurden mit Hilfe einer einfachen Aufhängevorrichtung Blätter und Sproß der in Töpfen angezogenen Versuchspflanzen mit dem „Kopf nach unten" in Leitungswasser getaucht. Der Topf wurde in einen Plastikbeutel eingeschlossen und am Unterende des Sprosses sorgfältig abgedichtet, um eine Verunreinigung des Wassers durch herabfallende Bodenpartikeln zu verhindern. Nach Verschließen des Exsikkators erfolgte die „Entlüftung" der Blätter durch Anlegen eines Vakuums (mit 2stufiger Röntgenpumpe der Firma Pfeiffer, Wetzlar). Durch Druckausgleich wurde das Blattgewebe mit Wasser infiltriert. Die so behandelten Pflanzen zeigten auf den Blättern — abhängig von der Dauer der Evakuierung — größere oder kleinere Areale, die infolge der Wasserdurchtränkung als dunkelgrüne Flecke in Erscheinung traten (englisch als 'water-soaked' bezeichnet). Eine erkennbare Schädigung des Pflanzengewebes war mit der Infiltration allein nicht verbunden. Wurden die infiltrierten Pflanzen in trockner Luft gehalten, dann verdampfte das in dem Interzellularsystem der Blätter „eingelagerte" Wasser schon nach etwa einer Stunde vollständig, und das Aussehen der Pflanzen war wieder normal. Die wasserdurchtränkten Blattzonen blieben jedoch für längere Zeit erhalten, wenn die Pflanzen nach der Infiltration in Räumen mit hoher Luftfeuchtigkeit gehalten wurden.

Die Infektion der Blätter erfolgte

a) durch Aufbringen der Bakterien (in Form gewaschener Suspensionen, Konz. etwa 10^7 Bakt./ml) auf die mit Wasser infiltrierten Blätter (Blattunterseite) oder

b) durch eine direkte Infiltration der Bakterien, indem Bakteriensuspensionen (Zellkonzentration etwa 10^7/ml) als Infiltrationsflüssigkeit verwendet wurden.

Nach der Beimpfung blieben die Pflanzen für zwei Tage in Kabinen mit 100%iger Feuchte (Temp. 25 °C), anschließend wurden sie im Gewächshaus bei normaler Feuchtigkeit (zwischen 50 % und 60 %) gehalten. Die Entwicklung der Symptome wurde eine Woche lang verfolgt.

3. Pathogenitätsteste an Bohnen

Wegen des erforderlichen Arbeitsaufwandes wurden nicht alle in Tabelle 1 aufgeführten Bakterienkulturen geprüft. Die Auswahl erfolgte in erster Linie nach dem Gesichtspunkt der „phagenmäßigen" Zusammengehörigkeit (vgl. Tab. 3). Die Beimpfung der Pflanzen wurde in einer Versuchsreihe nach der unter 2 a), in einer anderen nach der unter 2 b) angegebenen Impftechnik durchgeführt. Der Infektionserfolg war bei beiden Methoden gleich gut. In Tabelle 5 ist das Ergebnis der Pathogenitätsteste zusammengestellt worden. Ein Beispiel aus dieser Versuchsreihe zeigt Abbildung 4. Auf den Bohnenblättern werden, wie aus Tabelle 5 zu entnehmen ist, von einer großen Anzahl verschiedener Bakterien-„Arten" Nekrosen verursacht. Die von den für Bohnen typischen Erregern *Ps. phaseolicola* und *X. phaseoli* hervorgerufenen Blattnekrosen unterscheiden sich nicht von denen anderer Bakterien-„Arten". Es gibt zwar

Tabelle 5

Infektionsversuche an Bohnen

Nr.	Bakterium	Infektionserfolg	
	Spezies	Blattnekrosen	Besonderheiten
210	*Ps. phaseolicola*	±	
211	*Ps. phaseolicola*	±	
223	*Ps. phaseolicola*	+ +	
224	*Ps. phaseolicola*	+	
262	*Ps. phaseolicola*	+ +	
321	*Ps. phaseolicola*	+	
305	*Ps. medicaginis*	+ +	
306	*Ps. medicaginis*	+	
307	*Ps. medicaginis*	±	
265	*Ps. coronafaciens*	+ +	
247	*Ps. coronafaciens*	+ +	
257	*Ps. atrofaciens*	+ +	starke Blattvergilbung
286	*Ps. atrofaciens*	+ +	
259	*Ps. delphinii*	+ +	
279	*Ps. delphinii*	+ +	
258	*Ps. glycinea*	+	
239	*Ps. syringae*	+	
323	*Ps. syringae*	+	
324	*Ps. syringae*	+ +	
309	*Ps. syringae*	+ +	
261	*Ps. syringae*	+ +	
205	*Ps. morsprunorum*	+ +	
209	*Ps. morsprunorum*	+ +	
241	*Ps. morsprunorum*	+ +	
253	*Ps. tomato*	+	
288	*Ps. aptata*	+	
243	*Ps. cannabina*	±	
244	*Ps. mori* var. *huszei*	+	
250	*Ps. primulae*	+	
260	*Ps. tabaci*	+ +	
268	*Ps. lapsa*	+ +	
313	*Ps. aceris*	+ +	
267	*Ps. papulans*	+	
219	*Ps. rimaefaciens*	+	
252	*Ps. apii*	±	
333	*Ps.* sp. (von Zwetsche)	+ +	
339	*Ps.* sp. (von Erle)	+	
338	*Ps.* sp. (von Kirsche)	±	Vergilbungen
272	*Ps. tolaasii*	±	Läsionen sehr vereinzelt
278	*Ps. tolaasii*	±	Läsionen sehr vereinzelt
277	*Ps. savastanoi*	±	Läsionen sehr vereinzelt
297	Fluoreszent (aus Wasser)	—	
121	Bodenfluoreszent	—	
145	Bodenfluoreszent	—	

Tabelle 5 (Fortsetzung)

Nr.	Bakterium	Infektionserfolg	
	Spezies	Blattnekrosen	Besonderheiten
150	Bodenfluoreszent	—	
607	*X. campestris*	++	
610	*X. malvacearum*	+	Vergilbungen
611	*X. phaseoli*	++	
270	*Ps. solanacearum*	—	
315	*Ps. syringae*	++	
327	*Ps. asplenii*	++	
221	*Ps. tonelliana*	±	
205/R_4	*Ps. morsprunorum*	++	
241/R_1	*Ps. morsprunorum*	++	
265/R_2	*Ps. coronafaciens*	++	
—	*Bact. prodigiosum (S. marcescens)*	—	
—	*Bac. megaterium*	—	

Zeichenerklärung: ++ = vollständige Nekrotisierung der Blattspreite.
+ = zahlreiche Nekrosen.
± = wenige Einzelläsionen.

bei den einzelnen Kulturen Unterschiede in bezug auf das Ausmaß und die Schnelligkeit, mit der die Symptome zur Ausbildung gelangen, das gleiche ist aber auch bei den verschiedenen *Ps. phaseolicola*-Stämmen zu beobachten. Auffallend war, daß einige „Arten", die nach den ihnen zugestandenen Potenzen überhaupt keine Pathogenität für Bohnen besitzen dürften (vgl. ELLIOTT 1951), sogar virulenter waren als typische „Bohnenbakterien". Dazu gehörten unter

Abb. 4. Mit verschiedenen Bakterien-„Arten" beimpfte Bohnenpflanzen.
Von links nach rechts: *Ps. delphinii* (279) — Kontrolle — *Ps. syringae* (261)

anderem: *Ps. coronafaciens* (265), *Ps. delphinii* (259, 279), *Ps. morsprunorum* (205, 241), *Ps. tabaci* (260), *Ps. lapsa* (268) und *Ps. aceris* (313).

Die geprüften *Xanthomonas*-„Arten" (607, 610, 611) zeigten im Bohneninfektionstest ebenfalls keine auffallenden Differenzen.

Symptomlos blieben die Infektionen mit *Bact. prodigiosum* und *Bac. megaterium* (als Kontrollen). Auch von den Bodenfluoreszenten (297, 121, 145, 150) wurden trotz „phagenmäßig" guter Übereinstimmung mit gewissen pathogenen Stämmen keine Krankheitssymptome hervorgerufen. Sie verhielten sich wie typische Saprophyten.

Zur Vervollständigung der Pathogenitätsteste wurden auch einige Bakterienstämme geprüft, die mit den vorhandenen *Pseudomonas*-Phagen keine Reaktion zeigten. Während die Blattinfektion mit dem typischen Gefäßparasiten *Ps. solanacearum* (270) symptomlos verlief, traten bei *Ps. syringae* (315), *Ps. asplenii* (327) und *Ps. tonelliana* (221) Symptome auf. Wenn diese Stämme auch von keinem der isolierten Phagen lysiert werden, so ist das — wie schon an anderer Stelle bemerkt wurde — kein Beweis dafür, daß sie nicht in den Formenkreis der phytopathogenen Fluoreszenten gehören. Bei Einsatz eines noch größeren Phagenmaterials würde diese Beziehung vermutlich in Erscheinung treten.

Daß die Pathogenität von der Phagensensibilität (bezogen auf das vorhandene Phagenmaterial) unabhängig ist, zeigt auch der folgende Versuch: Aus den pathogenen Kulturen 205 (*Ps. morsprunorum*), 241 (*Ps. morsprunorum*) und 265 (*Ps. coronafaciens*) wurden die phagenresistenten Mutanten 205/R_1, 241/R_1 und 265/R_2 isoliert und auf Pathogenität geprüft. Alle drei Stämme behielten trotz veränderter Phagensensibilitätsspektren (Tab. 2) die den Elternkulturen 205, 241 und 265 eigene Pathogenität bei (Tab. 5).

Zusammenfassend kann über das Ergebnis der Pathogenitätsteste an Bohnen folgendes gesagt werden:

a) Verschiedene phytopathogene *Pseudomonas*-„Arten" mit ähnlichen Phagensensibilitätsspektren zeigen bei der Infektion von Bohnenblättern die gleichen pathogenen Potenzen.

b) Bodenfluoreszenten, auch wenn sie „phagenmäßig" große Ähnlichkeit zu pathogenen *Pseudomonas*-„Arten" zeigen, verursachen (bei der angewandten Impftechnik) keine Krankheitssymptome und verhalten sich wie typische Saprophyten.

c) Die Eigenschaft der Pathogenität können sowohl phagensensible als auch phagenresistente Kulturen (bezogen auf das eingesetzte Phagenmaterial) besitzen. Phagenresistente Mutanten, die aus einer Kultur phagensensibler Bakterien isoliert worden waren, behielten ihre Pathogenität bei.

4. Pathogenitätsteste an Salat

Geprüft wurden die für Salat als pathogen angegebenen Kulturen *Ps. viridilivida* (282), *Ps. marginalis* (249, 292) sowie einige „phagenmäßig" ver-

wandte Bakterien: *Ps. morsprunorum* (205) und die Bodenfluoreszenten 32, 79, 183 und 299 (= 7/3 v. RHODES). Es wurde folgendes Ergebnis erzielt:

Bakterium	Pathogenität
282	—
249	+
292	+
205	+
32	—
79	—
183	—
299	—

Auffallend war, daß eine authentische Kultur von *Ps. viridilivida* (282) keine Krankheitssymptome verursachte. Wenn man unterstellt, daß es sich bei 282 um eine Passage des Originalstammes und nicht um eine inzwischen durch Fremdinfektion veränderte Kultur handelt, dann muß aus dem negativen Ausfall des Pathogenitätstestes geschlossen werden, daß die Kultur ihre (ursprünglich vorhandene) Pathogenität verloren hat.

Von der Annahme ausgehend, daß in einer avirulenten Kultur spontan pathogene Mutanten auftreten, die im Blattgewebe selektiv zur Entwicklung gebracht werden könnten, wurden Versuche mit dem Ziel der Isolierung solcher Mutanten durchgeführt. Dazu wurden Salatblätter mit einer konzentrierten Bakteriensuspension (Stamm 282, Konz. über 10^{10} Bakt./ml) infiltriert. Bei dieser Technik traten, wie vermutet, vereinzelt Blattflecke auf, aus denen pathogene Bakterien reisoliert werden konnten. Durch Überprüfung des Phagenreaktionsspektrums konnte sichergestellt werden, daß es sich bei den Reisolierungen um Bakterien des eingeimpften Stammes (282) handelte. Wurde eine Reisolierung vermehrt und die Pathogenität erneut geprüft, dann erwies sich die von dem apathogenen Stamm abgeleitete Kultur als pathogen. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis eines Infektionstestes mit den Stämmen 205 (*Ps.*

Abb. 5. Infektion von Salatpflanzen (siehe Text).
Von links nach rechts: *Ps. morsprunorum* (205) — *Ps. viridilivida* (282, Originalkultur) — *Ps. viridilivida* (282/S_1, selektierte pathogene Mutante)

morsprunorum), 282 (*Ps. viridilivida*, apathogene Kultur) und 282/S_1 (*Ps. viridilivida*, selektierte pathogene Mutante) bei Anwendung „normaler" Bakteriensuspensionen (Konz. etwa 10^7Bakt./ml). Während die Beimpfung mit 282 symptomlos verläuft, wird durch 282/S_1 ebenso wie durch 205 eine typische Salatfäule verursacht.

Dieses Ergebnis wurde zum Anlaß genommen, auch andere „phagenmäßig" ähnliche, aber apathogene (saprophytische) Bakterienstämme auf das Vorhandensein pathogener Mutanten in einer Population hoher Zellzahl zu untersuchen.

5. Das Auftreten pathogener Mutanten in apathogenen Kulturen

Unter einer „apathogenen Kultur" soll in diesem Zusammenhang eine Bakterienpopulation verstanden werden, die im Gegensatz zu einer „pathogenen Kultur" bei der Infektion einer Pflanze mit Bakteriensuspensionen mittlerer Konzentration (etwa 10^7 Bakt./ml) keine erkennbaren Krankheitssymptome verursacht.

Wenn man annimmt, daß die Eigenschaft „Pathogenität" ebenso wie andere Eigenschaften spontan durch einen Mutationsschritt erworben werden oder verloren gehen kann, und wenn man die bei Bakterien übliche Mutationsrate (von etwa 10^{-9} je Zelle und Generation) zugrunde legt, dann ist um so eher mit der Entwicklung von Pathogenitätsmutanten zu rechnen, je mehr Bakterienzellen in das Blattgewebe eingebracht werden. Aus diesem Grunde wurden für die Infiltration stark konzentrierte Zellsuspensionen (etwa 10^{10} Bakt./ml) benutzt. Um toxische Wirkungen durch organische Nährstoffreste zu vermeiden, wurden die von Schrägröhrchen abgeschwemmten Bakterien zweimal gewaschen.

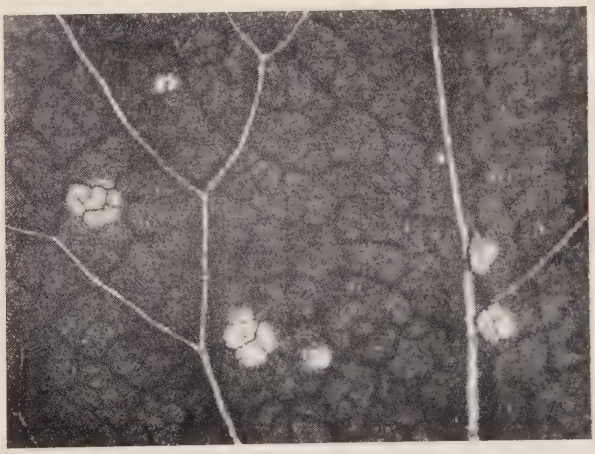


Abb. 6 (links). Infektion von Salat mit Stamm 183 (Bodenfluoreszent). Auftreten einer diskreten Lokalläsion (siehe Text)
Abb. 7 (rechts). Infektion von Salat mit Stamm 79 (Bodenfluoreszent). Auftreten einzelner Blattflecke (vgl. Text)

Abb. 8. Infektion von Salat (siehe Text).
Links: Stamm 32 (Bodenfluoreszent).
Rechts: Stamm 32/S_1 (aus 32 isolierte pathogene Mutante)

Bei Anwendung dieser Technik konnte beobachtet werden, daß auf einer infiltrierten Blattspreite gelegentlich diskrete Lokalläsionen auftraten (Abb. 6 und 7), in denen sich pathogene Bakterien entwickelt hatten. Für die Ausschließung von Fremdinfektionen wurde die Identität des Phagen-Lysotyps der eingeimpften und reisolierten Bakterien als ein hinreichend zuverlässiges Kriterium angesehen.

Auf Grund ihrer pathogenen Potenz können sich die Mutanten im infizierten Blattgewebe, wie auf einem Nähragar mit Selektivwirkung, „koloniemäßig" entwickeln. Die mit der beschriebenen Technik isolierten und zu einer Kultur vermehrten pathogenen Mutanten rufen auch dann Krankheitssymptome hervor, wenn „normale" Zellkonzentrationen verimpft werden und unterscheiden sich in dieser Hinsicht nicht von anderen pathogenen Kulturen. Abbildung 8 zeigt das Ergebnis eines Infektionstestes mit dem saprophytischen Bodenfluoreszenten 32 und der davon abgeleiteten pathogenen Mutante 32/S_1.

Abb. 9. Infektion von Salat (siehe Text).
Von links nach rechts: 282 — 282/S_2 — 32 — 32/S_1

Daß sich eine „authentische" phytopathogene *Pseudomonas*-Kultur

Abb. 10. Infektion von Bohnen (siehe Text). Links: 297 (Fluoreszent aus Wasser). Rechts: 297/B_1 (von 297 abgeleitete pathogene Mutante)

(wie *Ps. viridilivida*, 282), die ihre Pathogenität verloren hat, in bezug auf das Auftreten pathogener Mutanten prinzipiell nicht anders verhält als ein saprophytischer Bodenfluoreszent(32),wird noch einmal mit Abbildung 9 demonstriert.

Auf Bohnen konnten in entsprechender Weise pathogene Mutanten aus saprophytischen Populationen isoliert werden. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis eines Infektionstestes mit dem Stamm 297[1]) (= 47/1 v. Rhodes) und der davon abgeleiteten pathogenen Mutante 297/B_1. Die Infiltration erfolgte bei beiden Pflanzen mit Bakteriensuspensionen gleicher Zellkonzentration (etwa 10^7 Bakt./ml). Die von 297/B_1 hervorgerufenen Symptome werden in Abbildung 11 noch einmal vergrößert wiedergegeben.

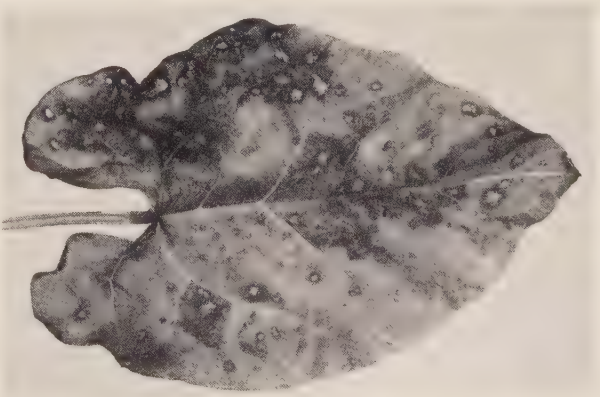


Abb. 11. Infektion von Bohnen. Vergrößerte Abbildung des infizierten Blattes aus Abbildung 10

Die Infiltrationsversuche mit hohen Zellkonzentrationen haben gezeigt, daß in saprophytischen Bakterienpopulationen pathogene Mutanten auftreten und sich selektiv entwickeln können. Ob dieser Mutationsschritt bei allen saprophytischen Fluoreszenten realisierbar ist

[1]) 297 ist eine Wasserisolierung, die nach Rhodes (1959) mit *Ps. marginalis* (Stamm 292 = d 289 v. Rhodes) physiologisch identisch ist.

oder nur bei solchen Typen auftritt, die pathogenen Bakterienstämmen genetisch nahestehen, muß dahingestellt bleiben und bedarf weiterer Untersuchungen. Offensichtlich scheint das den Phytopathologen primär interessierende Merkmal der Pathogenität aber ebenso der Mutabilität unterworfen zu sein, wie es bei anderen physiologischen Merkmalen der Fall ist. Die Schranke zwischen Parasiten und Saprophyten wird damit zu einem populationsgenetischen Problem. Zu welchen Stoffwechselleistungen ein Bakterium befähigt sein muß, um phytopathogen sein zu können, das ist eine andere Frage. In den mitgeteilten Untersuchungen ging es nicht um den Mechanismus der Pathogenität und seine stoffwechselphysiologische Grundlage, sondern allein um die Aufklärung des aus gemeinsamen Phagensensibilitäten postulierten Zusammenhanges zwischen verschiedenen phytopathogenen *Pseudomonas*- „Arten" untereinander und um die Beziehungen zwischen saprophytischen und parasitischen Fluoreszenten.

DISKUSSION

In der Phytopathologie wurden im Zusammenhang mit Bakteriophagen bislang vor allem praktische Ziele verfolgt. Man hat versucht, die bakteriolytische Wirkung der Phagen

1. für therapeutische Zwecke und
2. für die Identifizierung phytopathogener Bakterien-„Arten" sowie deren Nachweis in infizierten Pflanzengeweben

auszunutzen.

Bei der Diskussion der eigenen Untersuchungen interessieren nur die Ergebnisse zu Punkt 2. Zur Orientierung über die Literatur, auch zu Punkt 1, wird auf STOLP (1956) verwiesen.

Schon in den 40er Jahren wurde von THOMAS (1943, 1945, 1947) die Frage der Identifizierung phytopathogener Bakterien mit Hilfe von Phagen aufgegriffen. THORNBERRY, BRAUN und ELROD (1949) isolierten einen „spezifischen" Phagen für *X. pruni* und äußerten die Ansicht, daß die Phagenlysis-Methode als Identifizierungstechnik allgemeine Bedeutung erlangen könnte, „wenn hochspezifische Phagen auch für andere pathogene Arten gefunden werden". Mit der gemachten Einschränkung ist das durchaus richtig. Es fragt sich nur, ob die gewünschten „Art"-spezifischen Phagen überhaupt existieren.

Von KATZNELSON (1950) wurde erstmalig auf die Möglichkeit hingewiesen, phytopathogene Bakterien in pflanzlichen Geweben (speziell in Samen) mit Hilfe einer Phagenreaktion indirekt nachzuweisen. Diesem Verfahren liegt folgende Überlegung zugrunde: Gibt man zu zerkleinerten und in Nährlösung aufgeschwemmten Samen eine bekannte Anzahl von Phagenteilchen, die spezifische Aktivität für das in dem Samenmaterial vermutete phytopathogene Bakterium besitzen, dann wird durch einen Anstieg des Phagentiters, der mittels Plaquetest leicht zu ermitteln ist, das Vorhandensein des betreffenden Bakteriums angezeigt. Mit dieser Technik kann die Isolierung und Identifizierung des Erregers nach den bisher üblichen Methoden umgangen werden. Von KATZNELSON und SUTTON (1951) wird berichtet, daß die Phagentechnik bei der Untersuchung von infizierten Bohnen (auf *Ps. phaseolicola* bzw. *X. phaseoli*) mit Erfolg eingesetzt werden konnte. Auch der Nachweis von *Ps. pisi* in infizierten Erbsen (Samen) bzw. erkrankten Pflanzenteilen war möglich. SUTTON und KATZ-

Tabelle 6

Das Verhalten einiger Phagen
in bezug auf ihre Spezifität für phytopathogene Bakterien
(nach Literaturangaben)

Phage für:	Spezifisch	Unspezifisch da auch aktiv für:	Literatur
Ps. citri	+	—	Matsumoto u. Okabe (1937)
Ps. mori	—	+ (nicht angegeben)	Israilski u. Artemieva (1939)
Ps. tabaci (Ph 1)	—	*Ps. angulata*, *Ps. lachrymans*	Fulton (1950)
Ps. tabaci (Ph 2)	—	*Ps. angulata*, *Ps. coronafaciens* *Ps. phaseolicola*, *Ps. syringae*	Fulton (1950)
Streptomyces scabies	—	andere Bodenactinomyceten	Newbold u. Garrard (1954)
X. pruni	+	—	Eisenstark u. Bernstein (1955)
Str. griseus	—	*Str. olivaceus, viridis, griseolus, citreus, flavovirens, ipomaea, scabies*	Carvajal (1955)
X. trifolii	+	—	James u. Roslycky (1956)
X. phaseoli var. *fuscans*	+	—	Klement (1957); Klement u. Lovas (1960)
Corynebact. flaccumfaciens	+	—	Klement (1957); Klement u. Lovas (1960)
X. vesicatoria	+	—	Klement (1958, 1959)
Corynebact. flaccumfaciens	—	*Corynebact. poinsettiae*	Klement u. Lovas (1958)
Ps. polycolor	—	*Ps. aeruginosa*	Hoff u. Drake (1960)
Ps. lachrymans (Ph. LaP_1)	—	*Ps. morsprunorum*, *phaseolicola, syringae*	Klement u. Hevesi (1959)
Ps. sp. (Ph. CaP_2)	—	*Ps. marginalis, syringae, tomato, mori* var. *huszei, cannabina*	Klement (briefl. Mitteilung 1959)
Ps. sp. (Ph. MoP_1)	—	*Ps. mori*, *mori* var. *huszei, glycinea, lachrymans, morsprunorum, phaseolicola, syringae* var. *capsici, syringae* var. *populae, cannabina*	Klement, Lovrekovich u. Hevesi (1960)
Ps. sp. (Ph. MhP_1)	—	*Ps. mori* var. *huszei, morsprunorum, atrofaciens*	Klement, Lovrekovich u. Hevesi (1960)
X. sp. (Ph. 125)	—	Stämme von 22 *Xanthomonas*-Arten	Sutton, Katznelson u. Quadling (1958)

NELSON (1953) isolierten einen stammspezifischen und einen polyvirulenten Phagen; letzterer lysierte außer *Ps. pisi* auch Stämme von *Ps. glycinea, Ps. lachrymans* und *Ps. phaseolicola.* Aus infizierten Weizen- bzw. Haferkörnern konnten „spezifische" Phagen für *Ps. atrofaciens* und *Ps. coronafaciens* (SUTTON und KATZNELSON 1953), aus Gerste und Hafer „spezifische" Phagen für bestimmte „formae speciales" von *X. translucens* isoliert werden (KATZNELSON und SUTTON 1953). Das Ziel all dieser Untersuchungen war die Gewinnung „spezifischer" Phagen, um mit ihnen schnell und zuverlässig phytopathogene Bakterien nachweisen zu können. Die Methodik wurde in der Folgezeit verbessert (KATZNELSON, SUTTON und BAYLEY 1954) und auch bei anderen phytopathogenen Bakterien eingesetzt (z. B. WAKIMOTO 1954 bei *X. oryzae*). Ein technischer Fortschritt liegt in der Möglichkeit, mit Hilfe Antibiotika-resistenter Indikatorbakterien einen von Fremdkeimen nicht beeinträchtigten Plaque-Test durchführen zu können (COOK u. QUADLING 1959).

Für die Identifizierung und den Nachweis phytopathogener Bakterien in infizierten Pflanzengeweben ist die Spezifität der Phagen von entscheidender Bedeutung und unbedingte Voraussetzung. Wie sieht es bei den bislang untersuchten Phagen-Wirt-Systemen in dieser Hinsicht aus? Einige in Tabelle 6 zusammengestellte Beispiele geben darüber Auskunft. Die Übersicht läßt erkennen, daß im allgemeinen eine „Arten"-unspezifische Phagenwirkung beobachtet wird. Das gilt auch für nicht-phytopathogene Bakterien. So konnten z. B. keine „spezifischen" Phagen isoliert werden, mit deren Hilfe *Ps. fluorescens, Ps. putida* und *Ps. aeruginosa* hätten differenziert werden können. Auch Stämme mit gleichen biochemischen Leistungen in bezug auf Haemolyse, Fluoreszein-, Laevan- und Säurebildung zeigten keinen einheitlichen Lysotyp (KLINGE 1959). Über Phagen mit lytischer Aktivität für mehrere „Arten" der Gattung *Lactobacillus* ist von COETZEE, DE KLERK u. SACKS (1960) berichtet worden. Bei verschiedenen „Arten" von Bodenbakterien liegen ähnliche Verhältnisse vor (CONN u. Mitarb. 1945). Von ADAMS u. WADE (1954) sind Phagen isoliert worden, die sogar Bakterien verschiedener „Gattungen" (der Enterobacteriaceae) lysierten[1]).

Aus den zitierten Beispielen geht eindeutig hervor, daß die lytische Aktivität der Phagen nicht mit den im System aufgestellten „Arten" konform geht. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß auch verschiedene Isolierungen ein und derselben „Art" unterschiedlich reagieren können (s. Tab. 4). Von 25 *Ps. tabaci*-Stämmen (authentische Isolierungen aus Wildfeuer-krankem Tabak) waren nach FULTON (1950) 6 Stämme für einen und 5 für einen anderen *Ps. tabaci*-Phagen resistent. Ein weiteres Beispiel: Ein *Streptomyces*-Phage besaß nur für 13 von 15 geprüften *Str. scabies*-Stämmen lytische Aktivität (NEWBOLD u. GARRARD 1954).

Was die „unspezifische" Phagenwirkung (bezogen auf die Systematik) betrifft, so stehen die eigenen Befunde mit dem bislang Beobachteten in gutem Einklang. Die in der vorliegenden Arbeit geprüften Phagen besitzen (abgesehen von einigen wenigen Ausnahmen) lytische Aktivität für eine mehr oder weniger große Anzahl verschiedener Isolierungen (Tab. 2). Dabei ist besonders hervorzuheben, daß sich die Aktivität bestimmter Phagenstämme auf Bodenfluoreszenten und phytopathogene *Pseudomonas*-„Arten" erstreckt. Die für Bodenfluoreszenten isolierten Phagen (Nr. unter 200) lysieren zwar relativ mehr Bodenbakterien als phytopathogene Kulturen, entscheidend ist jedoch, daß keine Aktivitätsbegrenzung nach dem Gesichtspunkt der Pathogenität gegeben ist. Das gleiche gilt für diejenigen Phagen (Nr. über 200), die ursprünglich für phytopathogene Bakterien isoliert worden sind. Ihre Aktivität greift entsprechend auf saprophytische Bodenfluoreszenten über.

[1]) Damit zu vergleichen wären die *Pseudomonas*- und *Xanthomonas*-„Arten" lysierenden Phagenstämme 224, 228 und 219.

Wenn man bei einem gegebenen Phagenmaterial die Aktivität der einzelnen Phagentypen vergleicht, dann wird man gewissermaßen dazu verleitet, bestimmten Phagen das Prädikat „spezifisch" und anderen das Prädikat „unspezifisch" zu geben. Eine Charakterisierung auf dieser Grundlage hat aber offensichtlich wenig Sinn, weil das Urteil von dem Umfang des untersuchten Bakterienmaterials abhängt. Um das zu veranschaulichen, sei folgendes Beispiel angeführt:

Bakterium Stamm	Aktivität des Phagen α	Beurteilung der Phagenaktivität		
Spezies A				
a_1	+	Stamm-spezifisch (monovalent)	„Art"-spezifisch	unspezifisch (polyvalent)
a_2	—			
a_3	—			
a_4	—			
a_5	—			
a_6	—			
a_7	+			
a_8	—			
a_9	+			
a_{10}	—			
Spezies B				
b_1	—			
b_2	—			
Spezies C				
c_1	+			
c_2	—			

Würde die Aktivität des Phagen α ausschließlich bei den Stämmen a_1 bis a_5 (Spezies A) überprüft, dann wäre die Wirkung „Stamm-spezifisch", weil nur a_1 lysiert wird. Bei Einbeziehung der Stämme a_6 bis a_{10} (Spezies A) sowie b_1 und b_2 (Spezies B) müßte das Urteil „Art-spezifisch" lauten, da nur Stämme ein und derselben Spezies (A) angegriffen werden. Würde man schließlich noch c_1 und c_2 testen und feststellen, daß der Phage α auch den Stamm c_1 der Spezies C lysiert, dann hätte derselbe Phage als „unspezifisch" (polyvalent oder polyvirulent) zu gelten. Daß bei einem gegebenen Bakterienmaterial ein Phage sehr viele und ein anderer sehr wenige Bakterienstämme lysieren kann, soll damit nicht in Abrede gestellt werden. Die Bezeichnung „spezifisch" ist aber irreführend, sofern sie sich auf systematische Einheiten bezieht.

Wenn für Zwecke der Identifizierung phytopathogener Bakterien-„Arten" bzw. für ihren Nachweis in infizierten Pflanzengeweben „Art"-spezifische Phagen gefordert werden, dann dürften die Phagen in dieser Hinsicht „überfordert" sein. Die Beziehung zwischen Virus und Wirtszelle richtet

sich nicht nach der im System künstlich geschaffenen „Arten"-Ordnung, sondern wird von den natürlicherweise vorhandenen Affinitäten zur Wirtszelle bestimmt. Aus der theoretischen Phagenforschung ist bekannt, daß in einem lytischen bzw. lysogenen System Phage und Bakterium hereditäre Ähnlichkeiten besitzen. Temperente Phagen können sogar eine nicht zum Zelltod führende Infektion bewirken (Lysogenisation) und das phagengenetische Material in das Bakteriengenom integrieren. Da in einem Klon temperenter Bakteriophagen regelmäßig lytische (virulente) Mutanten auftreten, besteht zwischen diesen beiden Phagentypen kein grundsätzlicher Unterschied. Bei der Infektion einer sensiblen Bakterienzelle mit einem virulenten Phagenteilchen dringt die Phagennukleinsäure in das Zellinnere ein und schaltet als genetische Determinante den Bakterienstoffwechsel auf die identische Reproduktion der spezifischen Phagennukleinsäure um, was letzten Endes zum Zelltod und zur Freilassung neuer Phagenpartikeln führt.

Wenn Bakterienzellen, die zwei verschiedenen Klonen angehören, für ein und denselben Phagen anfällig sind, dann darf aus der ihnen gemeinsamen Sensibilität auf eine weitgehende Homologie in der genetischen Struktur geschlossen werden. In dem gleichartigen Verhalten kommt eine natürliche Verwandtschaft zum Ausdruck, der phylogenetische Beziehungen zugrunde liegen. Daß bei Phagentesten nur die positiven Reaktionen eine Aussage über verwandtschaftliche Beziehungen gestatten, wurde schon im Zusammenhang mit dem Auftreten phagenresistenter Mutanten erwähnt (vgl. S. 221, Anm. 1). Es mag hier noch ergänzt werden, daß in einer „Phagenpopulation" regelmäßig sogenannte Wirtsbereichmutanten (engl. host-range mutants) aufreten, die ihrerseits für phasenresistente Bakterienmutanten lytische Aktivität besitzen. In einem gegebenen Phagen-Wirt-System wird die Evolution phagenresistenter Bakterien durch das Auftreten von Phagenmutanten mit verändertem Wirtsbereich gewissermaßen „biologisch kompensiert".

Es leuchtet ein, daß die Möglichkeiten für das Erkennen verwandtschaftlicher Beziehungen mit zunehmender Zahl der in eine Untersuchung einbezogenen Phagen verbessert werden. Folgendes Beispiel macht das deutlich:

Bakterium	Phage:	1	2	3	4
A		+	—	—	+
B		—	+	—	+

Aus der Aktivität der Phagen 1, 2 und 3 läßt sich über die Beziehungen zwischen A und B nichts aussagen. Die gemeinsame Sensibilität für den Phagen 4 beweist jedoch ihre genetische Zusammengehörigkeit. Konkrete Beispiele dieser Art können dem vorgelegten Material (Tab. 2) entnommen werden. Ein zu dem obigen Schema analoger Fall wäre z. B. folgender:

Bakterium	Phage:	118	244	210	222
205		+	—	—	+
288		—	+	—	+

Wenn zwei oder mehr Bakterienkulturen von ein und demselben Phagen lysiert werden, dann haben sie — ganz unbestimmt ausgedrückt — „irgend

etwas" miteinander zu tun. Auch verschiedene Phagen gehören „irgendwie" zusammen, wenn sie in ihren lytischen Aktivitäten übereinstimmen. Sie müssen in ihrer genetischen Struktur ähnlich sein. Deshalb ist es möglich, auf der Grundlage von Phagenreaktionen auch dann auf verwandtschaftliche Beziehungen zwischen verschiedenen Bakterienstämmen zu schließen, wenn eine gemeinsame Phagensensibilität nicht vorliegt. Schematisch läßt sich das so darstellen:

Bakterium	Ph 1	Ph 2
A	+	—
B	+	+
C	—	+

Wegen der gleichen Phagensensibilität besteht ein Zusammenhang zwischen A und B (Ph 1) bzw. B und C (Ph 2). Da die Phagen Ph 1 und Ph 2 auf Grund ihrer gemeinsamen Aktivität für B genetisch ähnlich sind, müssen auch A und C, obwohl sie keinen „gemeinsamen" Phagen haben, miteinander verwandt sein.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß in bezug auf den Lysotyp (das Sensibilitätsspektrum) bei den untersuchten Fluoreszenten eine große Mannigfaltigkeit vorliegt. Wenn auch den einzelnen Bakterien-„Arten" keine charakteristischen Phagenreaktionsspektren zugeordnet werden können, weil spezifische Phagen im Sinne der Bakteriensystematik einfach nicht existieren, so ist es im Prinzip jedoch möglich, Bakterienisolierungen an Hand von Phagenspektren auf ihre natürliche Verwandtschaft hin zu überprüfen. Bei identischen Spektren (einheitlichem Lysotyp) dürfte vielfach ein abstammungsmäßiger Zusammenhang der verschiedenen Isolierungen gegeben sein. Diese Vergleichsmöglichkeit mag bei speziellen epidemiologischen Fragen, z. B. bei der Ausbreitung der direkten Nachkommenschaft eines Parasiten, wertvolle Aufschlüsse liefern. Die Aufstellung eines Typisierungsschemas für die verschiedensten in der Natur vorkommenden *Pseudomonas*- und *Xanthomonas*-Stämme ist schlechthin jedoch wegen der Vielzahl der Lysotypen praktisch nicht realisierbar.

Die Typisierungsmöglichkeiten hängen wesentlich von der natürlichen Verbreitung eines Bakteriums (mit all seinen Typen) ab. Das beweisen die Erfahrungen aus der medizinischen Bakteriologie[1]). Bei der Vi-Phagen-Typisierung von *Salmonella typhi*, die heute in vielen Ländern der Erde routinemäßig zur Differenzierung von Typhus-Stämmen eingesetzt wird und die Identifizierung von etwa 60 Typen und Subtypen des Typhuserregers erlaubt, liegen die Verhältnisse insofern besonders günstig, als nur relativ wenige Typhuserreger-Typen existieren. Bei den Staphylokokken sind die Typisierungsmöglichkeiten schon wesentlich schlechter, weil in der Natur erheblich mehr Staphylokokken-Typen verbreitet sind. Man hat in England geschätzt, daß im Vergleich zu einigen Hundert Typhusträgern mit etwa 15 Millionen Staphylokokkenträgern zu rechnen ist. Mit einem bestimmten Satz von Bakteriophagen konnten deshalb bei 221 epidemiologisch verschiedenen *Staphylococcus*-Isolierungen allein 169 Lysotypen differenziert werden. Trotz dieser Typenvielzahl ist aber auch bei Staphylokokken die Lysotypie gelegentlich mit Erfolg eingesetzt worden. So konnte z. B. in einem bestimmten Fall durch Vergleich des Lysotyps verschiedener Isolierungen eines Penicillin-resistenten *Staphylococcus* (Hospitalstamm) bewiesen werden, daß die Ausbreitung von einem einzelnen Bakterienträger (als Infektionsquelle) ausging (Blair u. Carr 1953).

[1]) Ergebnisse und Probleme der Lysotypie (in der medizinischen Bakteriologie) werden ausführlich bei Anderson u. Williams (1956) sowie Anderson (1959) behandelt.

In der Epidemiologie der phytopathogenen Bakterien hat die Phagenlysotypie bislang kaum Anwendung gefunden. Nach Untersuchungen von OKABE und NAITO (1954) konnten bei *Ps. solanacearum* mit einem Satz von neun Phagen 20 Lysotypen differenziert werden, und für die einzelnen Lysotypen wurde eine lokale Verteilung (räumlich begrenzt) festgestellt.

Wegen der weltweiten Verbreitung der Fluoreszenten und auf Grund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse (vgl. Tab. 2) darf angenommen werden, daß in der Natur eine enorm hohe Zahl verschiedener Lysotypen existiert. Infolgedessen wird eine Phagentypisierung der Pseudomonaden mit dem Ziel, alle Isolierungen in einem Schema unterzubringen, auch bei Einsatz eines noch so großen Satzes von Bakteriophagen kaum praktizierbar sein. Diese Tatsache ist für die Phytopathologie kein nennenswerter Nachteil, weil für eine Lysotypie im Sinne der in der medizinischen Bakteriologie eingesetzten Technik keine Notwendigkeit besteht. Bei Ausbruch einer Typhusepidemie ist es für die Ermittlung der Infektionsquelle und die Sicherung des epidemiologischen Zusammenhanges der auftretenden Krankheitsfälle vorteilhaft, wenn eine schnelle und zuverlässige Methode der Typendiagnostik zur Verfügung steht. Bei den bakteriellen Pflanzenkrankheiten würden vergleichbare Verhältnisse gegeben sein, wenn beispielsweise für das Auftreten von *Ps. morsprunorum* oder *Ps. delphinii* die „Einschleppung" der betreffenden Erreger aus einem anderen Krankheitsherd unbedingt vorausgesetzt werden müßte. Das ist aber offenbar nicht der Fall, wie an anderer Stelle noch auseinandergesetzt werden wird (vgl. Seite 244), und deshalb besteht auch keine Veranlassung, die Entwicklung eines Typisierungsschemas für die phytopathogenen Fluoreszenten anzustreben.

Die Versuche, mit Hilfe von „spezifischen" Phagen im System abgegrenzte „Arten" zu identifizieren, beruhen auf der Vorstellung, daß in der Natur Phagen existieren, die sich in ihrer Spezifität an die im System vorliegende „Arten"-Ordnung halten. Die gleiche Konzeption liegt dem Nachweis bestimmter Bakterien-„Arten" in infizierten Pflanzengeweben zugrunde. Die auf Phagenvermehrung basierende indirekte Nachweismethode für eine bestimmte Erreger-„Art" setzt aber voraus, daß

a) der benutzte Phage für den nachzuweisenden Erreger spezifische Aktivität besitzt und
b) alle Bakterien, die das gleiche Schadbild verursachen (bzw. die gleiche Pflanze befallen), ausnahmslos für den imaginären „Art"-Phagen sensibel sind.

Beides trifft nicht zu, und infolgedessen läßt sich die Methode auch nicht generell anwenden. Aus einer großen Anzahl von Bakterienstämmen, die z. B. von erkrankten Bohnen isoliert worden sind und auf Grund ihrer Pathogenität sowie bestimmter morphologischer und physiologischer Merkmale zu *Ps. phaseolicola* gestellt werden, reagieren in der Regel nur einige, aber nicht alle Stämme mit einem gegebenen Phagen (vgl. Tab. 4). Um es noch einmal anders auszudrücken: Ein spezifischer Phage, der ohne Ausnahme sämtliche Stämme einer bestimmten „Art" (als systematische Einheit) und keine anderen Bakterien lysiert, existiert nicht in der Natur. Folglich hat es auch keinen Sinn, sich

auf die Suche solcher hypothetischen Phagen zu konzentrieren. Auf die Schwierigkeiten, die sich aus der „unspezifischen" Phagenwirkung für die Diagnose von phytopathogenen Bakterien (im Sinne der Artbestimmung) ergeben, ist auch schon von anderer Seite (Crosse 1959, Billing, Crosse und Garrett 1960) hingewiesen worden.

Wenn in einem räumlich begrenzten Areal die Ausbreitung eines bestimmten Erregertyps vorliegt, dann darf mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß alle Isolierungen wegen ihres gemeinsamen Ursprungs (gemeinsamer Abstammung) auch dem gleichen Phagenreaktionstyp angehören. In diesem speziellen Fall kann die Phagentechnik für den Nachweis eines bestimmten Bakterientyps, wie Untersuchungen von Stolp (1960) gezeigt haben, mit Erfolg eingesetzt werden.

Auf Grund der Tatsache, daß Bakteriophagen mit den in der Phytopathologie aufgestellten „Arten" nicht spezifisch reagieren, wird vielfach die Auffassung vertreten, daß Phagenreaktionen für die praktisch wichtige Frage der Diagnose phytopathogener Bakterien von untergeordneter, wenn nicht gar zweifelhafter Bedeutung sind. Stapp (1958) schreibt zum Thema „Identifizierung mittels Bakteriophagen" unter anderem: „Um die Identität isolierter Bakterienkulturen mit einer bestimmten und bekannten pflanzenpathogenen Bakterienart festzustellen, kann man sich auch der spezifischen Bakteriophagen für die betreffende Art bedienen. Bei Artgleichheit wird durch die Phagen jeweils eine typische Wirkung auf den zu untersuchenden Bakterienstamm ausgeübt. Während man aber von jedem Bakterienstamm ein entsprechendes Antiserum herstellen kann, ist bis jetzt noch bei weitem nicht von allen pflanzenpathogenen Bakterien der korrespondierende Phage bekannt. . . . Des weiteren ist hier zu berücksichtigen, daß es spezifische Phagen gibt, die nur bei dem Bakterienstamm, von dem sie isoliert sind, Lyse hervorrufen, andere Stämme derselben Art aber nicht angreifen. Oder die Phagen sind polyvirulent, d. h., sie lysieren auch andere Bakterienarten. Es ist deshalb nicht einmal sicher, ob mit Hilfe von Phagen immer die Identität verschiedener Stämme geklärt werden kann, und es ist noch weniger sicher, ob damit verwandtschaftliche Verhältnisse aufgedeckt werden können, wie das aber auf serologischem Wege möglich ist."

Abgesehen davon, daß es die jeweils „korrespondierenden Phagen" der verschiedenen pflanzenpathogenen Bakterien-„Arten" überhaupt nicht gibt, kann die von Stapp vertretene Auffassung nicht geteilt werden, weil sie auf der Konzeption beruht, daß die Existenz der im System aufgeführten Bakterien-„Arten" eine fundamentale Tatsache ist. Wenn man diesen Standpunkt teilt, dann müßte man allerdings zugestehen, daß Bakteriophagen für die Identifizierung der „bekannten pflanzenpathogenen Bakterienarten" nicht von großem Wert sind. Von Starr (1959) wird die Tatsache der gemeinsamen Phagensensibilität verschiedener „Arten" folgendermaßen beurteilt: „The fact that a single phage preparation lyses bacterial strains originating from more than one kind of host plant (different bacterial species) supports the contention that such lysed bacteria are, in fact, biologically closely related — rather than the

defeatist attitude that bacteriophagy per se is inapplicable to determination of the bacterial phytopathogens." Dieser Auffassung muß auf Grund der eigenen Untersuchungsergebnisse voll und ganz zugestimmt werden.

Von der Überzeugung ausgehend, daß das „Arten"-Schema der Systematiker eine naturgegebene Ordnung widerspiegelt, ist wegen der Schwierigkeit, Bakterien mit den bisher üblichen Methoden nach „Arten" zu identifizieren, gelegentlich auf die Notwendigkeit der Entwicklung besserer Methoden hingewiesen worden. So ist bei BURKHOLDER (1939) zu lesen, daß „... many species have been described in detail using our present bacteriological methods and show no cultural or biochemical differences. Further tests not already in use might be devised which could bring out differences. Search for such tests appear to be a worthy object." Wenn heute — zwei Jahrzehnte später — immer noch keine besseren Methoden für die Identifizierung der phytopathogenen „Arten" existieren, dann liegt das vermutlich weniger an den Methoden als an den „Arten". Entscheidend ist die Frage, ob die vermuteten „Art"-Unterschiede tatsächlich vorhanden sind oder nur unterstellt werden.

Daß die von STAPP (1958) für überlegen gehaltene serologische Diagnostik ebenfalls (wie die Phagen) mit der Systematik in Widersprüche verwickelt ist, mag noch am Rande erwähnt sein. Dafür spricht schon allein die Tatsache, daß Bakterien von verschiedener „Art"-Zugehörigkeit dem gleichen serologischen Typ und Bakterienstämme der gleichen „Art" verschiedenen Serotypen angehören können (vgl. auch Anm. 2 Seite 221).

Die Schwierigkeit, phytopathogene Bakterien nach dem derzeitigen „Arten"-Schema zu identifizieren, könnte theoretisch in der Unzulänglichkeit der benutzten Methoden liegen; ebenso gut besteht aber die Möglichkeit, daß die „Arten"-Einteilung falsch ist. Wegen des Widerspruches in sich müßte jeder Versuch, Bakterien-„Arten" nachzuweisen, die gar nicht existieren, zum Scheitern verurteilt sein. Die Existenz der phytopathogenen Bakterien als krankheitserregende Mikroorganismen wird durch diese Feststellung in keiner Weise eingeschränkt. Aus kranken Pflanzen isolierte pathogene Bakterien sind zweifellos eine Realität. Die Frage, ob das in der Systematik vorliegende „Arten"-Schema ebenfalls eine reale Grundlage hat, muß nach den vorliegenden Untersuchungsergebnissen jedoch verneint werden. Die Systematik der phytopathogenen Pseudomonaden wird für grundsätzlich falsch gehalten. Von den fast 100 im System aufgeführten verschiedenen *Pseudomonas*-„Arten" repräsentieren die Fluoreszenten[1]) (d. h. die überwiegende Mehrzahl der phytopatho-

[1]) Da die Ausbildung des grün-fluoreszierenden Farbstoffes stark Nährboden-abhängig ist und das Farbstoffbildungsvermögen unter Umständen auch ganz verloren gehen kann, ist es nicht in allen Fällen möglich, die Zugehörigkeit zu den Fluoreszenten allein nach dem Merkmal der grünen Fluoreszenz festzustellen. Außerdem existieren Farbvarianten, die einen wasserlöslichen braunen Farbstoff produzieren und die trotzdem auf Grund gemeinsamer Phagensensibilitäten zu dem Formenkreis der grün-fluoreszierenden Bakterien gerechnet werden müssen. Am Rande sei vermerkt, daß die authentischen Kulturen 247 (*Ps. coronafaciens*) und 281 (*Ps. primulae*) das Substrat braun verfärben (YE), obwohl für diese „Arten" im BERGEY grüne Fluoreszenz angegeben wird. Andererseits verfärbt von zwei *Ps. delphinii*-Stämmen (259, 279), für die Braunfärbung des Agars angegeben wird, nur einer (259) das Substrat in der „geforderten" Weise.

genen *Pseudomonas*-„Arten") einen einheitlichen Bakterientyp, deren Vertreter potentiell zu den gleichen Leistungen befähigt sind.

Auf der Grundlage gemeinsamer Phagensensibilitäten können bei den Fluoreszenten nahe verwandtschaftliche (genetische) Beziehungen festgestellt werden. Hinsichtlich der Phagenspektren unterscheiden sich verschiedene „Arten" nicht mehr und nicht weniger als verschiedene Stämme einer bestimmten „Art" (Tab. 2). Das Hauptkriterium für die Abgrenzung der verschiedenen Isolierungen, die „spezifische Pathogenität" für ganz bestimmte Wirtspflanzen, beruht darüber hinaus auf einer Annahme, die den tatsächlichen Verhältnissen nicht entspricht. Infektionsversuche haben gezeigt, das „phagenmäßig" zusammengehörende pathogene Fluoreszenten — gleichgültig, von welcher Pflanze sie ursprünglich isoliert und mit welchem „Art"-Namen sie etikettiert worden sind — in ihren pathogenen Potenzen übereinstimmen. Fluoreszenten, die von einer bestimmten Pflanzenart isoliert worden sind und als Vertreter einer bestimmten Bakterien-„Art" angesehen werden, können nicht nur auf dem Ursprungswirt, sondern auch auf „inadäquaten" Pflanzen (für die sie laut „Vorschrift" keine pathogenen Potenzen besitzen sollten) Krankheitssymptome hervorrufen. Graduelle Unterschiede in der Virulenz schließen die p o t e n t i e l l e Gleichwertigkeit verschiedener Isolierungen nicht aus. Daß die in der Natur an bestimmten Pflanzen isolierten Fluoreszenten bei künstlicher Infektion im allgemeinen (aber nicht immer, vgl. Seite 228) auf ihrem Herkunftswirt eine größere Virulenz entfalten als auf „fremden" Wirtspflanzen, ist nicht unbedingt als ein Beweis für das Vorliegen einer „spezifischen" Pathogenität anzusehen. Zweifellos werden sich auf einem bestimmten Wirt (als Substrat) die am besten an das Wirtsgewebe angepaßten Stoffwechseltypen herausselektieren. Diese Feststellung schließt jedoch nicht aus, daß sich aus derselben Bakterienpopulation auf einem anderen Wirt entsprechend gut „angepaßte" pathogene Stoffwechseltypen selektiv entwickeln. Selbst aus einer Population, die im „normalen" Infektionstest keine Symptome verursacht, können bei Anwendung einer geeigneten Technik pathogene Mutanten isoliert werden (vgl. S. 231). Das Merkmal „Pathogenität", das erfahrungsgemäß (bei Dauerpassagen) in künstlicher Kultur verloren gehen kann und über dessen stoffwechselphysiologische Grundlage bislang nur bei einigen Bakterien (z. B. Toxinbildnern) Näheres bekannt ist, nimmt zwar in der Phytopathologie eine besondere Stellung ein, ist vom Standpunkt der allgemeinen Bakteriologie aber nichts weiter als eine spezielle Stoffwechselleistung, die ebenso wie andere Eigenschaften spontan (oder induziert) durch Mutation erworben werden oder verloren gehen kann. Damit soll natürlich nicht gesagt sein, daß jedes beliebige, in der Natur vorkommende Bakterium zu einem phytopathogenen Bakterium mit der Fähigkeit, in einem Wirtsgewebe Krankheitserscheinungen hervorzurufen, „mutieren" kann. Das Auftreten pathogener Mutanten in einer apathogenen Population (bezogen auf einen bestimmten Wirt) setzt voraus, daß dieser Mutationsschritt im Rahmen der Mutationsmöglichkeiten des betreffenden Bakterientyps liegt. Ebensowenig wie in einer Population von *Bact. prodigiosum* (= *S. marcescens*) grün-fluoreszierende Mutanten zu erwarten sind, ebenso wenig können Bazillen oder Corynebakterien zu phytopathogenen Fluoreszen-

ten mutieren. Darüber gibt es keine Diskussion! Die grün-fluoreszierenden Pseudomonaden gehören jedoch in ihrer Gesamtheit (pathogene und saprophytische) in einen Formenkreis genetisch nahe verwandter Bakterien, die offensichtlich die Eigenschaft der Pathogenität für diese oder jene Wirtspflanze durch Mutation erwerben oder verlieren können. Der Verlust der Pathogenität (in künstlicher Dauerkultur) ist eine allgemein akzeptierte Erfahrungstatsache. Anders steht es mit dem „Pathogenwerden" einer saprophytischen Kultur. STAPP (1955) vertritt die Auffassung, daß „die gewöhnlichen, in Wasser, Boden und in der Luft verbreiteten Fluoreszenten nicht als Pflanzenparasiten in Frage kommen". An einer anderen Stelle heißt es: „Infektionsversuche gaben keinerlei Anhaltspunkte dafür, daß die gewöhnlichen, in diesen Medien (Anm. des Autors: Boden, Wasser, Luft) verbreiteten Fluoreszenten pathogene Eigenschaften besitzen." Diese Vorstellung entspricht nach den eigenen experimentellen Befunden nicht den Tatsachen. Die Pathogenität der Fluoreszenten ist ein populationsgenetisches Problem.In einer „statistisch-apathogenen" Population können pathogene Mutanten auftreten, die — selektiv zur Entwicklung gebracht — eine „statistisch-pathogene" Population (Stamm, Kultur) repräsentieren. Bei dieser Sachlage dürften Bodenfluoreszenten durchaus als das Reservoir der phytopathogenen Fluoreszenten angesehen werden können. Für das Auftreten einer Bakteriose muß nicht in jedem Falle die „Einschleppung" des „spezifischen" Erregers (vom Typ der Fluoreszenten) gefordert werden. Ist erst einmal ein primärer Infektionsherd vorhanden, dann erfolgt die Ausbreitung des in der Pflanze „angereicherten" Erregers unabhängig davon, ob der pathogene Typ eingeschleppt worden ist oder sich lokal als eine Mutante der saprophytischen Flora entwickelt hat. Daß der dargelegte Zusammenhang zwischen parasitischen und saprophytischen Fluoreszenten für die Epidemiologie der pflanzlichen Bakteriosen neue Perspektiven eröffnet, soll nur kurz angedeutet werden[1]).

Die Tatsache, daß Bakterien von verschiedener „Art"-Zugehörigkeit an ein und derselben Pflanze nicht zu unterscheidende Symptome hervorrufen können (siehe Tab. 5 sowie Abb. 3 und 4), spricht eindeutig gegen die den einzelnen „Arten" zugeschriebene „spezifische Pathogenität". Aus diesem Grunde wird es für wenig sinnvoll gehalten, die von verschiedenen Pflanzen isolierten Fluoreszenten als besondere „Arten" voneinander abzugrenzen, es sei denn, man will mit der „Art"-Bezeichnung in erster Linie die Herkunft der Isolierung zum Ausdruck bringen. Selbst wenn man berücksichtigt, daß in dem Gewebe einer b e s t i m m t e n Pflanze ein Bakterientyp zur Entwicklung kommen kann, der im „normalen" Infektionstest bei anderen Pflanzen keine Symptome verursacht, so ist es nicht zu vertreten, solche Typen als „Arten" oder auch nur als „formae speciales" abzugrenzen, sofern in einer Population dieses Typs die Potenz verankert ist, über die selektive Entwicklung von Mutanten in eine andere „Art" oder „forma specialis" überzugehen. Bei den durchgeführten Infektionstesten mit v e r s c h i e d e n e n Bakterien-„Arten" an e i n e r Wirtspflanze war bei der Mehrzahl der geprüften Kulturen eine gleichwertige

[1]) Das Problem der Entstehung primärer Infektionsherde und der epidemischen Ausbreitung phytopathogener Fluoreszenten wird in einer folgenden Arbeit ausführlicher behandelt.

Pathogenität zu beobachten. Wenn trotz massiver Beimpfung (mit den Originalkulturen) nur vereinzelt Symptome auftraten, konnte jedoch in allen untersuchten Fällen über die Reisolierung des in einer Lokalläsion zur Entwicklung gekommenen Bakterientyps ein virulenter (d. h. für die betreffende Pflanze „statistisch-pathogener") Stamm gewonnen werden. Offenbar besitzen Populationen der verschiedenen „Arten" eine pathogene „Kapazität", die über die Selektion spezifischer Stoffwechseltypen eine „Anpassung" an zahlreiche Wirtspflanzenarten gestattet. Dieser Vorgang ist mit dem Übergang von einer „Art" in eine andere „Art" gleichzusetzen. Infolgedessen hat es keinen Sinn, bei den phytopathogenen Fluoreszenten verschiedene „Arten" zu unterscheiden. Alle Isolierungen, die auf Grund der dargelegten Argumente zusammengehören, müssen nicht unbedingt in allen „aktuellen" Merkmalen identisch sein. Entscheidend ist, daß sie in ihren potentiellen Eigenschaften übereinstimmen.

Die Unterschiede in der Symptomausbildung — darauf soll in diesem Zusammenhang noch kurz hingewiesen werden — sind ebenfalls kein spezifisches Attribut einer bestimmten Erreger-„Art". Sie hängen weitgehend von dem Ausmaß des Befalls und der Anatomie des infizierten Blattgewebes ab. Streifige Symptome, wie sie bei Getreide auftreten (*Ps. striafaciens*), können nicht bei Gurkenblättern erwartet werden, und umgekehrt ist eine „eckige Blattfleckenkrankheit" (*Ps. lachrymans*) nicht bei Monokotylen zu erwarten.

Wenn auch die eigenen Untersuchungen nur Aussagen über die Verhältnisse bei den phytopathogenen Pseudomonaden gestatten, so darf angenommen werden, daß in anderen Gattungen ähnliche Verhältnisse vorliegen. Das dürfte insbesondere für die zahlreichen *Xanthomonas*-„Arten" zutreffen. Aus der gemeinsamen Phagensensibilität von grün-fluoreszierenden Pseudomonaden und gelb-pigmentierten Xanthomonaden (vgl. Tab. 2) kann darüber hinaus auf eine nahe Verwandtschaft zwischen Vertretern dieser beiden Gattungen geschlossen werden. Vielleicht hat sich die unterschiedliche Farbstoffbildung von ein und demselben Grundtyp ausgehend entwickelt. Dafür spricht — abgesehen von der gemeinsamen Phagensensibilität — auch die Beobachtung, daß *Xanthomonas*-Stämme ihre Pigmentbildung (ebenso wie die Fluoreszenten) verlieren können und daß sie dann von farblosen Pseudomonaden nach physiologischen Merkmalen nicht mehr zu unterscheiden sind (Billing 1960 b; Feststellung von Holding).

Das zur Zeit gültige „Arten"-Schema der phytopathogenen Fluoreszenten wird als Arbeitsgrundlage in der Phytopathologie für wertlos gehalten, weil es den tatsächlichen Verhältnissen nicht gerecht wird. Das „Durcheinander" auf der Ebene der Spezies dürfte in erster Linie, worauf auch schon von Starr (1959) hingewiesen wurde, auf das im Laufe der Jahre mehr und mehr zur Anwendung gekommene Klischee: „Neuer Wirt — Neue Art" zurückzuführen sein. Man hat vielfach bewußt Unterschiede gesucht (und auch gefunden), um die Entdeckung neuer „Arten" zu sichern. Andererseits sah man sich hier und da auf Grund vergleichender Untersuchungen gezwungen, bestimmte, in das System aufgenommene „Arten" mit anderen für identisch zu halten. Ein klassisches Beispiel bieten die zahlreichen (etwa 20) mit *Ps. syringae* inzwischen

für identisch erklärten „Arten" (vgl. ELLIOTT 1951). Trotz dieser rückläufigen Tendenz, die in BERGEY's „Manual of Determinative Bacteriology" von einer Auflage zur anderen zu beobachten ist, wird gerade in der Phytopathologie gelegentlich mit besonderem Nachdruck auf die große Zahl der verschiedenen Erreger hingewiesen. So schreibt STAPP (1959) unter anderem, „daß z. Zt. rund 230 verschiedene bakterielle Pflanzenkrankheiten und ihre Erreger in der Weltliteratur aufgeführt sind. Auch wenn sich später noch herausstellen sollte, daß es sich bei dem einen oder anderen Erreger nicht um eine selbständige Art, sondern um ein Synonym handelt, dürften dennoch weit mehr als 200 Bakteriosen übrigbleiben. Verglichen mit den bakteriellen Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier ist das eine enorm hohe Zahl!" Die Zahl ist in der Tat enorm hoch, und das allein sollte schon Anlaß zu Bedenken geben. Man muß zunächst einmal scharf trennen zwischen der Anzahl der Bakteriosen (bezogen auf die verschiedenen Pflanzen, die von Bakterien befallen werden) und der Anzahl der Erreger-„Arten". Schon allein auf Grund der bei den Fluoreszenten gewonnenen Erkenntnisse kann die von STAPP vertretene Auffassung nicht geteilt werden. Vermutlich bleiben in einer zukünftigen Systematik der phytopathogenen Bakterien von den 200 „Arten" nur wenige übrig[1]). Die Zahl der Bakteriosen — bezogen auf die von Bakterien befallenen Pflanzenarten — wird durch diese Feststellung nicht reduziert. Man muß im Gegenteil damit rechnen, daß auch in Zukunft Bakterien als Krankheitserreger bei bislang nicht als anfällig bekannten Wirtspflanzen entdeckt werden. In solchen Fällen müssen aber nicht notwendigerweise n e u e „Arten" im Spiel sein.

Verf. konnte vor kurzem aus Blattflecken an Brennesseln einen im künstlichen Infektionstest hoch-virulenten Fluoreszenten (Stamm 342) isolieren. Nach der bisher üblichen Praxis hätte der Name *Ps. urticae* n. sp. vorgeschlagen werden können. Interessanterweise war das Phagen-Sensibilitätsspektrum dieses Stammes mit dem eines Fluoreszenten (Stamm 341) identisch, der aus erkrankten Walnußblättern isoliert worden war. Der natürlich befallene Brennesselbestand befand sich unmittelbar unter dem erkrankten Walnußbaum. Offensichtlich stand die Infektion der Walnuß- und Brennesselblätter in einem Zusammenhang. Obwohl im allgemeinen aus erkrankten Walnußblättern Bakterien vom Typ *Xanthomonas* (*X. juglandis*) isoliert werden, ist das Auftreten pathogener Fluoreszenten an Walnußbäumen nicht ungewöhnlich. In Californien wurde ein *Ps. syringae*-ähnliches Bakterium (bei *Juglans mandschurica*) sogar in epidemischer Form beobachtet (ARK u. BELL 1959). Das an Brennesseln aufgetretene Bakterium könnte somit wegen seiner Herkunft als *Ps. urticae* n. sp., wegen des Zusammenhangs mit der Walnußisolierung als *Ps. juglandis* n. sp. oder wegen der für Bohnen festgestellten Pathogenität als *Ps. phaseolicola* bezeichnet werden. Weder das eine noch das andere wäre sinnvoll, denn es handelt sich offensichtlich um ein Bakterium, das dem Grundtyp der pathogenen Fluoreszenten entspricht und keine Merkmale aufweist, die eine Abgrenzung von anderen Vertretern dieses Typs rechtfertigen.

Mit der Entdeckung „neuer" Krankheiten, genauer gesagt: mit der Feststellung von Bakteriosen bei solchen Wirtspflanzen, von denen phytopathogene Bakterien bislang nicht isoliert worden sind, taucht immer wieder das Problem der Klassifizierung der Erreger auf. Auch in jüngster Zeit wird das Problem vielfach mit der Schaffung „neuer Arten" gelöst.

[1]) Es ist nicht beabsichtigt, im Rahmen der vorliegenden Arbeit Vorschläge für eine systematische Neuordnung der phytopathogenen Bakterien zu machen. Hier soll zunächst nur gezeigt werden, daß die bisherige Ordnung auf falschen Vorstellung beruht.

Beispiele: *Ps. oryzicola* n. sp. (KLEMENT 1955), *Ps. cannabina* (SUTIČ u. DOWSON 1959), *Ps. rubi idaei* n. sp. (NATALINA, VORONKEVICH u. KUTZNETSOWA 1954), *Ps. tagetis* n. sp. (HELLMERS 1955), *Ps. pastinacea* n. sp. (BURKHOLDER 1960), *Ps. gardneri* n. sp. bzw. *Ps. gardneri* var. *capsici* nov. var. (SUTIČ 1957). Gelegentlich beschränkt man sich auf die Feststellung, daß eine bisher nicht bekannte Krankheit durch Bakterien vom *Pseudomonas*-Typ verursacht wird (COSTA u. Mitarb. 1957; an Kaffee), ohne sich auf eine bestimmte „Art" festzulegen. Oder man kommt zu dem Ergebnis, daß eine schon bekannte Bakterien-„Art" an neuen Wirtspflanzen auftritt, wie *Ps. cichorii* an Tabak (ROBBS 1960) oder *Ps. marginalis* an Dahlien (CLARK MARJORIE u. PATON 1956). Von KNÖSEL (1959) ist eine „neue" Bakteriose an Blumenkohl untersucht worden, die von einem *X. campestris* nahestehenden, aber nicht mit diesem identischen Bakterium verursacht wird. KLEMENT (1956) hält den Erreger einer Bakteriennaßfäule an Paprika für eine biologische Rasse von *Ps. syringae*. ZACHOS (1958) konnte zeigen, daß eine neue Fruchtfleckenkrankheit der Oliven, ebenso wie die Oliventuberkulose, durch *P. savastanoi* hervorgerufen wird. Dieser Befund ist insofern besonders interessant, als hier ein und derselben Erreger-„Art" die Fähigkeit zur Ausbildung völlig verschiedener Symptome zugeschrieben wird.

Schon seit Jahrzehnten ist die Literatur über pflanzliche Bakteriosen dadurch gekennzeichnet, daß die Auffassungen über die „Arten", ihre Beziehungen zueinander und ihre systematische Stellung laufend korrigiert werden.

Es soll in diesem Zusammenhang nur auf einige wenige Beispiele hingewiesen werden[1]): SMITH und FAWCETT stellen 1930 fest, daß die „Arten" *Ps. citriputealis* und *Ps. citrarefaciens* mit *Ps. syringae* identisch sind. HEDGES (1930) beweist die Identität von *Ps. phaseolicola* und *Ps. puerariae*. *Ps. marginalis* (aus Salat) und *Ps. aptata* (aus Rüben) werden für nahe verwandt (LACEY 1932), *Ps. hibisci* und *Ps. syringae* für identisch gehalten (SMITH 1943). Auch *Ps. morsprunorum, syringae, prunicola, pisi, tabaci* und *phaseolicola* lassen sich auf biochemischer Grundlage nicht differenzieren (ERIKSON 1945). *Ps. intybi* und *Ps. marginalis, Ps. cichorii* und *Ps. viridiflava* sowie *X. lactucae* und *X. vitians* werden von BURKHOLDER (1954) als identisch erkannt. VOLCANI (1954) hält verschiedene Isolierungen aus Tomate und Zwiebel für Varietäten von *Ps. syringae*. STARR, VOLCANI und MUNNECKE (1955) kommen auf Grund von Pathogenitätstesten zu der Auffassung, daß *X. geranii* und *X. pelargonii* als Synonyme zu betrachten sind. Von HOFFMANN (1954, 1958) wird auf die Identität der für Kartoffel- und Rübenschorf verantwortlichen *Streptomyces*-„Arten" hingewiesen. Zahlreiche weitere Beispiele ließen sich hier anführen.

Durch das „Für und Wider" in der Frage der Existenz einmal eingeführter „Arten" ist es den Bearbeitern einer Neuauflage des „BERGEY" offenbar nicht immer leicht gefallen, sich für die Streichung einer „Art" zu entscheiden. Infolgedessen sind zahlreiche experimentelle Befunde, die für die Identität verschiedener „Arten" sprechen, auch in der letzten Auflage des „BERGEY" (1957) unberücksichtigt geblieben.

Daß es schwierig und vielfach unmöglich ist, Bakterienkulturen nach physiologischen Eigenschaften zu klassifizieren, haben CONN, WOLFE und FORD schon 1940 erkannt. Es sei betont, daß diese Kalamität nicht nur bei phytopathogenen, sondern auch bei anderen *Pseudomonas*-„Arten" besteht. Allein nach biologischen Merkmalen ließen sich z. B. weder *Ps. fluorescens* und *Ps. putrefaciens* noch *Ps. aeruginosa, Ps. chlororaphis* und *Ps. putida* differenzieren (GABY 1955). Auf der Grundlage physiologischer Merkmale konnten SELEEN und STARK (1943) 199 untersuchte Fluoreszenten zwar in 14 Gruppen einteilen, aber mit der im „BERGEY" für *Ps. fluorescens* gegebenen Beschreibung

1) Verschiedene der im folgenden genannten „Arten" sind inzwischen im System gestrichen worden.

stimmte keine dieser Gruppen völlig überein. Auf die große Variabilität, die in den biochemischen Leistungen bei verschiedenen Stämmen einer „Art" zu beobachten ist, haben MUSHIN und Mitarbeiter (1959 a) besonders hingewiesen.

HOLLIS (1952) vertritt die Ansicht, daß die phytopathogenen „Arten" (einer Gattung) in sehr enger Beziehung zueinander stehen, und er vermutet, daß die Krankheitserreger als ein Ergebnis von Mutation und Selektion in Erscheinung treten. In umfangreichen Untersuchungen hat RHODES (1959) feststellen können, daß bekannte phytopathogene „Arten" (*Ps. marginalis, medicaginis* var. *phaseolicola, angulata, barkeri*) in ihren biochemischen Leistungen eindeutig mit zufällig isolierten Boden- (bzw. Wasser-) Fluoreszenten übereinstimmen. In den eigenen Untersuchungen erwies sich der Stamm 297 (= 47/1 von RHODES), der in seinen physiologischen Eigenschaften mit *Ps. marginalis* (292) identisch ist, im „normalen" Bohneninfektionstest zwar als apathogen, muß aber als ein potentieller Parasit angesehen werden, weil aus der Ausgangskultur pathogene Mutanten isoliert werden konnten (vgl. Seite 233). Daß die morphologischen und physiologischen Merkmale der phytopathogenen Pseudomonaden „nicht so konstant sind, daß sie für eine Artabgrenzung herangezogen werden können" und daß „die Art *Ps. syringae* mindestens viele der heute noch als besondere Arten angesehenen pflanzenpathogenen *Pseudomonas*-Stämme mit umfaßt", ist die auf Grund von Kreuzinfektionstesten und serologischen Untersuchungen von BORTELS und GEHRING (1960) vertretene Ansicht.

Schon 1925 wurde von ST. JOHN-BROOKS, NAIN und RHODES auf serologische Verwandtschaftsbeziehungen zwischen parasitischen und saprophytischen Pseudomonaden hingewiesen. ROSEN und BLEEKER (1933) äußerten auf Grund serologischer Identität verschiedener *Pseudomonas*-„Arten" die Überzeugung, "that no useful purpose is served in erecting new species on the basis of a few cultural and physiological differences or on assumed host-relationship". Die serologische Identität von *Ps. syringae* und *Ps. lapsa* sowie die Tatsache, daß verschiedene *Ps. marginalis*-Stämme serologisch unterschiedlich reagierten, werden von FRIEDMANN (1953) als Beweis dafür angeführt, daß es unsicher ist, Isolierungen allein auf Grund ihres serologischen Verhaltens zu identifizieren. ELROD und BRAUN (1947) stellten fest, daß auch verschiedene „Arten" der Gattung *Xanthomonas* gemeinsame Antigene besitzen. Da *X. carotae* mit *X. campestris, X. phaseoli, X. juglandis* und *Ps. medicaginis* var. *phaseolicola* mit *Ps. pisi* serologisch reagierte, vertritt MUSHIN (1959 b) die Auffassung, daß serologische Reaktionen für bakteriologisch-taxonomische Zwecke wohl nützlich, aber nicht allein ausschlaggebend sein können. Trotzdem sind gerade serologische Unterschiede vielfach als Beweis für die Existenz kulturell und physiologisch sonst nicht zu differenzierender „Arten" herangezogen worden. So ist z. B. STAPP (1938) auf der Basis von Agglutinationstesten für eine Abgrenzung von *X. begoniae* und *X. campestris* eingetreten.

Obwohl der taxonomische Wert physiologischer Merkmale sehr umstritten ist, werden auch Unterschiede im physiologischen Verhalten vielfach als Beweis für die Existenz besonderer „Arten" (STAPP 1935, bei *Ps. viridilivida, Ps. marginalis, Ps. endiviae, Ps. intybi*) oder bestimmter Varietäten angesehen. So unterscheidet STAPP (1956) außer dem im „BERGEY" aufgenommenen *Ps. coronafaciens* (Elliott) Stevens noch die Varietät *Ps. coronafaciens* var. *atropurpurea* (Reddy et Godkin) Stapp. Sie ist „ein mit *Ps. coronafaciens* morphologisch und kulturell weitgehend übereinstimmender Mikroorganismus, der sich aber im Hinblick auf seine Pathogenität und die Symptome von ersterem unterscheidet". Außerdem ist sie „durchschnittlich etwas plumper (1,92 μ mal 0,72 μ) und hat einen höheren thermalen Tötungspunkt". (Für *Ps. coronafaciens* wird eine Größe von 2,3 $\mu \times$ 0,65 μ angegeben!) Auch Wachstumsunterschiede der Bakterien (WORMALD 1942) und selbst Unterschiede in der Größe der Läsionen bei ein und derselben Wirtspflanze (MILLER u. Mitarb. 1940) werden gelegentlich für die Differenzierung der „Arten" herangezogen.

Obwohl die den „Arten" zugeordnete Wirtsspezifität vielfach nicht bestätigt werden konnte, ist merkwürdigerweise nur in Einzelfällen eine Korrektur der Systematik erfolgt. Johnson, Slagg u. Murwin haben schon 1924 gezeigt, daß mit *Ps. tabaci* zahlreiche Pflanzen aus 24 Familien infiziert werden können. Galatchian (1941) stellte fest, daß der Erreger der „basalen Spelzenfäule des Weizens", *Ps. atrofaciens*, auch für Kartoffeln und Tomaten pathogene Eigenschaften besitzt. Die Konsequenz aus dieser Beobachtung war eine Erweiterung des Wirtsbereichs: Zu *Triticum aestivum* und *Hordeum vulgare* wurden *Solanum tuberosum* und *Lycopersicum esculentum* hinzugefügt. An die Möglichkeit einer Identität von *Ps. coronafaciens* und *Ps. tomato* wagte man offenbar nicht zu denken. Entgegen der „Vorschrift" konnte Fuchs (1957) mit *Ps. morsprunorum* Pflanzen infizieren, die mit *Prunus*-Arten nicht verwandt sind. Auch Stämme von *Ps. matthiolae, Ps. nectarophila, Ps. barkeri* und *Ps. rimaefaciens* waren (ebenso wie *Ps. morsprunorum*) in ihrer Fähigkeit, höhere Pflanzen zu infizieren und zu schädigen, unspezifisch. Die genannten „Arten" werden deshalb als Synonyme von *Ps. syringae* angesehen. Dye (1958, 1959) stellte bei den Xanthomonaden fest, daß in Labortesten nicht zu differenzierende „Arten" einen gleichwertigen „potentiellen Wirtsbereich" besitzen. Nach vier Impfpassagen auf Bohnen besaßen 20 verschiedene *Xanthomonas*-„Arten" die für *Xanthomonas phaseoli* typischen Eigenschaften. Daß sich die Wirtsbereiche bei den *Xanthomonas*-„Arten" überlappen, ist auch von Sabet (1959) festgestellt worden. Demgegenüber hat Wernham (1948) behauptet, daß die Xanthomonaden in ihrer Wirtsreaktion spezifisch sind, und daß es keine Irrtumsmöglichkeiten gibt, den Wirt als „Spezies-Bestimmer" einzusetzen. Auch Logan (1960) neigt zu dieser Auffassung und interpretiert eigene Untersuchungsergebnisse als Beweis gegen die Dyeschen Befunde.

Daß Isolierungen aus bestimmten Pflanzen bei nicht korrespondierenden Wirten weniger pathogen sind als auf ihrem „Ursprungswirt", ist mehrfach beobachtet worden (Allington u. Chamberlain 1949, Chamberlain 1952, 1956). Generell dürfte diese Feststellung jedoch nicht gelten, denn bei den eigenen Versuchen waren einige „wirtsfremde Arten" bei künstlicher Infektion von Bohnen sogar virulenter als die typischen *Ps. phaseolicola*-Stämme (vgl. S. 228). Von größerer Bedeutung dürfte für das Problem der Wirtsspezifität die Tatsache sein, daß aus schwach pathogenen oder selbst apathogenen Populationen (bezogen auf eine bestimmte Wirtspflanze) hoch-virulente Mutanten selektiert werden können (vgl. S. 231). Daß spezielle Stoffwechseltypen auch unter natürlichen Bedingungen auftreten, ist eine bekannte Erscheinung. Von Brinkerhoff (1959) wird z. B. berichtet, daß für resistente Baumwollsorten (resistent gegen *X. malvacearum*) nach einiger Zeit Bakterienstämme auftraten, die in der Lage waren, die Resistenz des Wirtes zu durchbrechen.

Eine mehr oder weniger große Variabilität ist generell bei verschiedenen Isolierungen ein und desselben Erregers zu beobachten. Bei *Erwinia amylovora* unterscheidet Billing (1960 a) aus diesem Grunde typische und atypische Stämme. Auch wenn ein bestimmter Krankheitserreger in der Regel durch charakteristische Stoffwechselaktivitäten ausgezeichnet ist, werden gelegentlich Abweichungen von dem typischen Verhalten beobachtet. So konnten Hoffmann, Kiesewalter und Müller (1960) einen Lactose-positiven Typhusstamm isolieren, obwohl die negative Reaktion auf Lactose als ein charakteristisches und stabiles Merkmal des Typhuserregers angesehen wird.

Das stoffwechselphysiologische Verhalten der in einen Formenkreis (z. B. den der Fluoreszenten) gehörenden Bakterien ist zwar in vielen Eigenschaften ausgesprochen variabel, trotzdem können bei bestimmten Bakterientypen einzelne Stoffwechselleistungen als charakteristisch gelten. Im Gegensatz zu den Xanthomonaden wachsen beispielsweise *Pseudomonas*-Stämme gut in einem synthetischen Substrat, das als alleinige C- und N-Quelle Asparagin enthält (Starr u. Mitarb. 1943). Auch der schnelle Abbau von Arginin ist für *Pseudomonas*-Kulturen charakteristisch (Sherris u. Mitarb. 1959). Die Pseudomonaden und Xanthomonaden unterscheiden sich außerdem in ihrer Toleranz gegenüber der Giftwirkung von TTC (= Triphenyltetrazoliumchlorid), wie Lovrekovich und Klement (1960) mitgeteilt haben.

Die minimalen Ernährungsansprüche der verschiedensten phytopathogenen Bakterien wurden eingehend von Starr (1946, 1949, 1950) untersucht. Es stellte sich heraus, daß die für eine Bakterienentwicklung notwendigen Nährstoffe praktisch in jeder Pflanze zur Verfügung stehen. Im Vergleich zu den Pseudomonaden sind relativ mehr *Xanthomonas*-Stämme lipolytisch aktiv (Starr u. Burkholder 1942). Für *Ps. solanacearum* wird die Bildung von

poly-β-Hydroxybuttersäure (mit Sudan nachweisbar) als charakteristisch angesehen (HAYWARD 1960). Daß diese Stoffwechselleistung bei den übrigen Pseudomonaden — mit Ausnahme von *Ps. caryophylli* und einigen wenigen anderen „Arten" — nicht zu beachten ist, kann als ein weiterer Beweis für die Sonderstellung der Gefäßparasiten *Ps. solanacearum* und *Ps. caryophylli* betrachtet werden. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß diese Krankheitserreger auch „phagenmäßig" mit den typischen Fluoreszenten keinen Zusammenhang erkennen lassen.

Es mag noch erwähnt werden, daß neben den coliformen Naßfäuleerregern (*Pectobacterium carotovorum* [Jones] Waldee) auch typische Fluoreszenten pektinolytische Aktivität besitzen (JONES u. DOWSON 1950, CEPONIS u. FRIEDMAN 1959, DOWSON 1941 a, OXFORD 1944, GRAHAM 1958, SMITH 1958). Nach PATON (1958) verfügen etwa 10 % aller Stämme über Pektinasen. DOWSON (1941 b) isolierte ein Naßfäulebakterium, das in seinen biochemischen Eigenschaften völlig mit *Ps. phaseolicola* übereinstimmte.

Im allgemeinen kann über die Pathogenität einer Bakterienkultur nur der Infektionstest Auskunft geben. Bei *Ps. solanacearum* und *X. phaseoli* ist jedoch ein Zusammenhang zwischen der Virulenz und dem Reduktionsvermögen für TTC (= Triphenyltetrazoliumchlorid) festgestellt worden. Auf einem TTC-Nährboden treten avirulente Bakterien von *Ps. solanacearum* durch eine intensive Rotfärbung der Kolonien (stark reduzierend) in Erscheinung (KELMAN 1954). Demgegenüber sollen bei *X. phaseoli* die intensiv rot gefärbten Kolonien besonders pathogen sein (SMALE u. WORLEY 1956). Daß sowohl in der Natur isolierte Stämme (SUTIČ 1956: bei *X. corylina*) als auch im Labor isolierte Mutanten (QUADLING 1960 b: bei *X. phaseoli*) eines pathogenen Bakteriums unterschiedliche Virulenz besitzen können, ist im Hinblick auf die Variabilität physiologischer Eigenschaften verständlich. Nach den eigenen Untersuchungen bleibt die Pathogenität einer Bakterienzelle bei der Mutation zur Phagenresistenz erhalten (vgl. S. 229). Andererseits können Bakterienzellen einer apathogenen Population ohne Änderung des Phagenreaktionstyps pathogen werden (vgl. S. 232). Die Eigenschaft „Pathogenität" ist somit in bezug auf den Phagenreaktionstyp eine unabhängige Variante. Auch bei der Mutation zur Streptomycin-Resistenz bleibt nach QUADLING (1960 a) die Pathogenität erhalten.

Es ist verständlich, daß wegen der guten Übereinstimmung in ihrem kulturellen Verhalten gelegentlich ein Zusammenhang zwischen saprophytischen und pathogenen Fluoreszenten angenommen worden ist. Bislang hat es jedoch an einer exakten Beweisführung gefehlt. Schon 1912 hat SCHUSTER, wenn auch ohne experimentelle Grundlage, eine verwandtschaftliche Beziehung zwischen *Ps. xanthochlora* und *Ps. fluorescens* postuliert. Wie schon erwähnt, wird von STAPP (1955) im Gegensatz zu der in dieser Arbeit begründeten Vorstellung die Möglichkeit einer Beteiligung saprophytischer Bodenfluoreszenten an der Entstehung von Pflanzenkrankheiten generell abgelehnt. Es mag der Vollständigkeit halber darauf hingewiesen werden, daß auch schon *Ps. aptata* für einen Stamm von *Ps. aeruginosa* (PAINE u. BRANFOOT 1924) und *Ps. tabaci* für eine physiologische Variante von *Ps. fluorescens* (REID u. Mitarb. 1939) gehalten worden ist. CLAYTON (1936) konnte Tabak-Wildfeuer mit einem Stamm von *Ps. fluorescens* erzeugen. Auch REID und Mitarb. (1942) isolierten ein Bodenbakterium, das Wildfeuer verursachte und hielten *Ps. fluorescens, Ps. tabaci* und *Ps. angulata* für identisch[1]). Von ELROD und BRAUN (1941, 1942) wird berichtet, daß sich Kulturen von *Ps. polycolor* und *Ps. aeruginosa* (kein Pflanzenparasit!) in ihrer pathogenen Potenz nicht unterscheiden und als e i n e „Art" gelten müssen. Die beiden Krankheitserreger besitzen sowohl phytopathogene als auch tierpathogene Eigenschaften. Daß *Ps. polycolor* und *Ps. aeruginosa* auch auf der Basis gemeinsamer Phagensensibilität zusammengehören, haben inzwischen HOFF und DRAKE (1960) festgestellt. Wie METHA und BERRIDGE (1924) mitgeteilt haben, soll *Ps. aeruginosa* (früher: *Ps. pyocyanea*) auch mit *Ps. marginalis* identisch sein.

Von Pflanzenteilen lassen sich fast regelmäßig Gelbkeime (früher als *B. herbicola*, heute als *X. trifolii* bezeichnet) isolieren, die sich morphologisch und physiologisch wie *X. translucens* verhalten (JAMES 1955). Ob diese saprophytischen Gelbkeime mit pathogenen Xanthomonaden genetisch zusammenhängen, darüber ist bislang nichts bekannt.

[1]) Daß *Ps. tabaci* und *Ps. angulata* als Synonyme zu betrachten sind, war schon vorher von STAPP (1930) gefordert worden.

Bei vergleichenden Untersuchungen ist immer wieder beobachtet worden, daß die in der Systematik erfolgte Abgrenzung der verschiedenen *Pseudomonas*-„Arten" mit den experimentellen Befunden nicht in bestem Einklang steht. Selbst in bezug auf solche Merkmale, denen besondere taxonomische Bedeutung zugesprochen wird (Wirtsspezifität, serologisches Verhalten), ist das zu beobachtende „Durcheinander" eine nicht zu leugnende Tatsache. In diesem Zusammenhang mag noch erwähnt werden, daß selbst der Typ der Begeißelung kein „konstantes Merkmal" darstellt (SNEATH 1956).

BURKHOLDER und STARR haben schon 1948 erkannt, daß es unmöglich ist, mit den üblichen bakteriologischen Untersuchungsmethoden phytopathogene Bakterien als „Arten" zu identifizieren. Von LYSENKO und SNEATH (1959) wird darauf hingewiesen, daß es in vielen Fällen nicht gelingt, ein an sich bekanntes Bakterium zu bestimmen, wenn es an einem ungewöhnlichen (neuen) Standort isoliert wird. Wegen der bei den verschiedensten Bakterien zu beobachtenden Mutabilität in bezug auf Koloniemorphologie und Stoffwechselleistungen sind SHIMWELL und CARR (1960) der Meinung, daß es im Prinzip unmöglich ist, Bakterienisolierungen nach „Arten" (im Sinne der derzeitigen Systematik) zu klassifizieren. Die eigenen Untersuchungsergebnisse beweisen die Unzulänglichkeit der „Arten"-Abgrenzung bei den phytopathogenen Pseudomonaden und unterstützen die schon vielfach von anderer Seite erhobene Kritik. Über kurz oder lang werden aus dieser Situation die Konsequenzen gezogen werden müssen. Das Chaos auf der Ebene der „Spezies" ist im Grunde genommen nicht überraschend, wenn man bedenkt, daß in der Bakteriensystematik mit „Arten" operiert wird, obwohl eine eindeutige Definition der Bakterienart bis heute nicht existiert. Von COWAN (1959) wird diese Paradoxie sehr treffend in der folgenden Definition zum Ausdruck gebracht: „A species is what a competent specialist would accept as a species." Nach einer Analyse der gegenwärtigen Situation kommt COWAN zu der Auffassung, daß sich in der Bakteriensystematik die Rückkehr zu einer vereinfachten Taxonomie anbahnen wird. Er ist der Meinung, daß die genetischen Beziehungen in den Vordergrund gestellt werden müßten, um ein besseres System der Bakterien aufbauen zu können. Da genetische Kriterien bei der Klassifizierung der Bakterien bislang unberücksichtigt geblieben sind, ist die Bakteriensystematik nach SCHAEFFER (1958) nur ein praktisches Instrument, das es erlaubt, „de grouper les bactéries d'après leurs caractères écologiques, morphologiques, biochimiques, sérologiques et pathogènes". Bei den phytopathogenen Pseudomonaden kann die derzeitige Systematik nicht einmal als ein „praktisches Instrument" bezeichnet werden, denn bei einer großen Anzahl der für verschieden gehaltenen „Arten" handelt es sich offensichtlich um ein und dasselbe. Der „Art"-Name ist bei dieser Sachlage eigentlich nichts weiter als ein Etikett, auf dem die Herkunft der betreffenden Isolierung bescheinigt wird.

Die auf der Grundlage von Phagen-Wirt-Beziehungen durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß in dem Formenkreis der phytopathogenen Fluoreszenten sogenannte „authentische Arten" nicht weniger miteinander verwandt sind als verschiedene Isolierungen (Stämme) ein und derselben „Art". Außerdem ist die den einzelnen „Arten" zugesprochene „spezifische Pathoge-

nität" eine Annahme, die nicht den Tatsachen entspricht. Folglich besteht kein Grund, die von verschiedenen Wirtspflanzen isolierten Fluoreszenten mit gleichen potentiellen Eigenschaften als verschiedene „Arten" anzusehen.

Wenn man die im „BERGEY" aufgeführten phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" einmal aus dieser Sicht betrachtet, dann kommt man zu folgendem Ergebnis: 1. Die Erreger von Gefäßbakteriosen (*Ps. caryophylli, lignicola, saliciperda, solanacearum, radiciperda*) sowie einige nicht zu den typischen Fluoreszenten gehörende Naßfäuleerreger (*Ps. alliicola, cepacia, eriobotryae, gladioli, maublancii, melophthora*) haben mit den anderen *Pseudomonas*-„Arten" wahrscheinlich nichts zu tun. Auch *Ps. cattleyae* und *Ps. woodsii* nehmen vermutlich eine Sonderstellung ein. 2. Von den verbleibenden 81 „Arten" sind 32 als unsicher zu bewerten, da sie meist nur einmal irgendwo aufgetreten und beschrieben worden sind. Es handelt sich um: *Ps. alboprecipitans, andropogonis, astragali, bowlesiae, calendulae, castaneae, cissicola, colurnae, cumini, desaiana, dysoxyli, fabae, gardeniae, helianthi, iridicola, levistici, ligustri, mangiferaeindicae, martyniae, panacis, panacimiliacei, passiflorae, petasitis, polygoni, ribicola, seminum, setariae, stizolobii, viciae, vitiswoodrowii, washingtoniae* und *wieringae*. Bei einem Teil dieser „Arten" handelt es sich, nach den vorliegenden Angaben, offensichtlich auch um Fluoreszenten. Daß die genannten Bakterien an den betreffenden Pflanzen, nach denen sie meist bezeichnet wurden, tatsächlich aufgetreten sind, daran wird nicht gezweifelt. Im Rahmen dieser Betrachtung sollen sie aber ausgeklammert werden, da zu wenig von ihnen bekannt ist. 3. Der Rest von 49 „Arten" umfaßt die phytopathogenen Fluoreszenten. Eine Zusammenstellung wird in Tabelle 7 gegeben. Von den untersuchten 35 *Pseudomonas*-„Arten" wurden 28, d. h. 80 %, als „phagenmäßig" zusammenhängend erkannt. Es ist mit Sicherheit anzunehmen, daß der Prozentsatz bei Verwendung eines größeren Phagensatzes noch höher liegen würde.

Auf Grund der mitgeteilten Untersuchungsergebnisse dürfte es sich bei den in Tabelle 7 aufgeführten „Arten" um ein und denselben Krankheitserreger handeln. Selbst wenn sich verschiedene Isolierungen in diesem oder jenem Merkmal unterscheiden, so sind die Vertreter der einzelnen „Arten" wegen der ihnen gemeinsamen stoffwechselphysiologischen und pathogenen Potenzen (der „Kapazität" für verschiedene Wirtspflanzen) als gleichwertig zu betrachten. Ob man nun die Fluoreszenten in einer „Art" vereinigt oder wegen der Unzulänglichkeit des Artbegriffes in der Bakteriologie eine andere Bezeichnung wählt, ist für die rein bakteriologische Seite des Problems von untergeordneter Bedeutung. Die Zusammenfassung verschiedener Bakterienisolierungen zu einer systematischen Einheit dürfte nicht zweckmäßig sein, wenn trotz gemeinsamer Phagensensibilität relativ stabile Unterscheidungsmerkmale vorliegen (wie z. B. bei den Pseudomonaden und Xanthomonaden). Bei den phytopathogenen Fluoreszenten ist es jedoch ungerechtfertigt, verschiedene Isolierungen, die morphologisch und physiologisch in der gleichen Variationsbreite liegen und über gleichwertige pathogene Potenzen verfügen, nur wegen der Herkunft von dieser oder jener Pflanze als besondere „Arten" abzugrenzen.

Tabelle 7

Die „phagenmäßig" zusammengehörenden phytopathogenen *Pseudomonas*-Arten vom Typ der Fluoreszenten

1.	*Ps. aceris*	26.	*Ps. mori* +
2.	(*Ps. aleuritidis*)	27.	*Ps. morsprunorum* +
3.	(*Ps. ananas*)	28.	(*Ps. nectarophila*)
4.	*Ps. angulata*	29.	*Ps. papulans* +
5.	*Ps. apii* +	30.	*Ps. phaseolicola* +
6.	*Ps. aptata* +	31.	*Ps. pisi* +
7.	*Ps. asplenii*	32.	(*Ps. polycolor*)
8.	*Ps. atrofaciens* +	33.	*Ps. primulae* +
9.	*Ps. barkeri*	34.	(*Ps. pseudozoogloeae*)
10.	(*Ps. berberidis*)	35.	*Ps. rimaefaciens* +
11.	(*Ps. betle*)	36.	*Ps. savastanoi* +
12.	*Ps. cichorii*	37.	(*Ps. sesami*)
13.	*Ps. coronafaciens* +	38.	(*P. striafaciens*)
14.	*Ps. delphinii* +	39.	*Ps. syringae* +
15.	(*Ps. erodii*)	40.	*Ps. tabaci* +
16.	*Ps. glycinea* +	41.	*Ps. tolaasii* +
17.	*Ps. intybi* (= *marginalis*) +	42.	*Ps. tomato* +
18.	*Ps. lachrymans* +	43.	*Ps. tonelliana*
19.	*Ps. lapsa* +	44.	(*Ps. viburni*)
20.	*Ps. maculicola*	45.	*Ps. viridiflava* +
21.	*Ps. marginalis* +	46.	*Ps. viridilivida* +
22.	*Ps. marginata*	47.	(*Ps. xanthochlora*)
23.	(*Ps. matthiolae*)	48.	*Ps. cannabina*[1]) +
24.	*Ps. medicaginis* +	49.	*Ps. mori* var. *huszei*[1]) +
25.	(*Ps. mellea*)		

Erläuterung: Für die mit einem + versehenen „Arten" wurden „phagenmäßig" verwandtschaftliche Zusammenhänge festgestellt.
Von den in ( ) gesetzten „Arten" standen keine authentischen Stämme zur Verfügung.

[1]) Im „Bergey" nicht aufgenommene „Arten". Die untersuchten Stämme (243 und 244) wurden freundlicherweise von Herrn Klement (Budapest) zur Verfügung gestellt. Literatur über *Ps. cannabina* bei Sutič und Dowson (1959), über *Ps. mori* var. *huszei* bei Klement u. Mitarb. (1960).

Die Folgerung, daß weit weniger „echte Arten" existieren als es die gegenwärtige Lehrmeinung vorsieht, wird auch durch neuere Ergebnisse aus Transformationsversuchen unterstützt. Mit der aus einer Streptomycin-resistenten Kultur von *X. phaseoli* gewonnenen DNS (Desoxyribosenukleinsäure) ließ sich das (genetisch fixierte) Merkmal „Streptomycin-Resistenz" auf verschiedene *Xanthomonas*-„Arten" übertragen (Corey u. Starr 1957b). Auch die genetisch kontrollierte Polysaccharidproduktion konnte transformiert werden (Corey u. Starr 1957a). Aus der medizinischen Bakteriologie sind etliche Beispiele bekannt für die Transformation antigener Eigenschaften, die früher als „Art"-charakteristisch angesehen wurden (vgl. „Bergey", Seite 383, für

Salmonella spp.). Die Vorstellung von der Stabilität der „Arten" ist darüber hinaus auch durch Phagenwirkungen (Transduktion und Konversion) ins Schwanken geraten. So kann beispielsweise das Toxinbildungsvermögen, auf dem die Pathogenität von Diphtherie-Stämmen beruht, durch Lysogenisation (Infektion mit temperenten Phagen) auf atoxigene Stämme übertragen werden (FREEMAN 1951, GROMAN 1953). Über die Lysogenie bei phytopathogenen Bakterien ist bislang nur wenig bekannt. Die Existenz lysogener Systeme ist jedoch bei *X. pruni* (EISENSTARK, GOLDBERG u. BERNSTEIN 1955), *Agr. tumefaciens* (BEARDSLEY 1960) und *Ps. solanacearum* (TSUJITA u. MATSUI 1955, OKABE u. GOTO 1955) nachgewiesen worden.

Aus den eigenen Untersuchungen müssen zwei Punkte besonders herausgestellt werden:

1. Bei zahlreichen Isolierungen von phytopathogenen Fluoreszenten handelt es sich um ein und denselben Erreger.
2. In einer Population saprophytischer Fluoreszenten treten phytopathogene Mutanten auf.

Die Beziehungen zwischen parasitischen und saprophytischen Fluoreszenten dürften vor allem für das Verständnis epidemiologischer Vorgänge von Bedeutung sein. Offensichtlich können in einer „statistisch-apathogenen" Population Stoffwechseltypen (Mutanten) auftreten, die pathogene Eigenschaften besitzen. Ihre Entstehung dürfte — ebenso wie bei antibiotika- und phagenresistenten Mutanten — spontan und unabhängig von dem selektierenden Agens erfolgen. Von ihrer besonderen Befähigung können die pathogenen Stoffwechseltypen jedoch nur dann „Gebrauch machen", wenn sie in ein Milieu geraten, in dem sie nicht-pathogenen Bakterien gegenüber selektiv begünstigt sind. Insofern kommt der Pflanze als Substrat eine selektierende Wirkung zu.

Auch bei anderen phytopathogenen Bakterien müssen Beziehungen zu saprophytischen Bodenbakterien vermutet werden. DALZELL (1957) gelang es, *Aerobacter cloacae* durch DNS-Transformation in *Erwinia tracheiphila* umzuwandeln. Man darf annehmen, daß diese „Art"-Umwandlung auch durch Spontanmutation (d. h. unabhängig von der Zufuhr spezifischer DNS) möglich ist, denn im allgemeinen können Eigenschaftsänderungen (z. B. die Streptomycin-Resistenz) sowohl durch DNS-Transformation als auch durch Mutation hervorgerufen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten experimentellen Befunde lassen erkennen, daß auf dem Gebiet der pflanzlichen Bakteriosen in grundlegenden Fragen einschneidende Korrekturen an der gegenwärtig vertretenen Lehrmeinung notwendig sind. STARR (1959) hat kürzlich mit folgenden Worten auf den sich in der Phytopathologie anbahnenden Umbruch hingewiesen:

"Certainly, no one can deny that we are facing a major breakthrough in understanding the origin of phytopathogenicity in otherwise ordinary bacteria. Time — and much additional effort — will undoubtedly disclose the actual mechanism; its impact on diagnosis and control of plant disease, quarantine procedures, bacterial taxonomy, genetics and other aspects of phytopathology and microbiology will inevitably be profound."

Zusammenfassung

Bei 200 Bodenisolierungen vom Typ *Pseudomonas fluorescens* und 150 phytopathogenen *Pseudomonas*-Kulturen von verschiedener „Art"-Zugehörigkeit wurde die Aktivität von 65 Bakteriophagenstämmen untersucht, um auf der Grundlage des Vergleichs der Sensibilitätsspektren natürliche Verwandtschaftsbeziehungen festzustellen.

Das Ergebnis der Phagenteste läßt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Ein gegebener Phagenstamm lysiert nicht nur den „korrespondierenden" (für die Phagenisolierung eingesetzten) Bakterienstamm, sondern auch verschiedene andere Isolierungen. Die lytische Aktivität kann sich auf phytopathogene und saprophytische Fluoreszenten erstrecken. In bezug auf die im System abgegrenzten „Arten" verhalten sich die Bakteriophagen unspezifisch.

2. Ein gegebener Bakterienstamm kann von mehreren Phagenstämmen lysiert werden. Obwohl bei den Fluoreszenten eine Vielzahl von Lysotypen existiert, können ähnliche Sensibilitätsspektren (mit gemeinsamen Phagensensibilitäten) sowohl bei parasitischen als auch bei saprophytischen Bakterienstämmen festgestellt werden.

3. Verschiedene Isolierungen einer bestimmten phytopathogenen „Art" lassen keinen engeren Zusammenhang erkennen als Bakterienstämme von verschiedener „Art"-Zugehörigkeit.

Da parasitische und saprophytische Fluoreszenten wegen ihrer natürlichen Verwandtschaftsbeziehungen als Vertreter eines einheitlichen Bakterientyps betrachtet werden müssen, wurden die pathogenen Eigenschaften „phagenmäßig" zusammengehörender Bakterien untersucht.

Das Ergebnis der Infektionsteste läßt sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die zu den Fluoreszenten gehörenden phytopathogenen *Pseudomonas*-„Arten" besitzen gleichwertige pathogene Potenzen und können nicht auf Grund der ihnen zugeschriebenen „spezifischen Pathogenität" (für ganz bestimmte Wirtspflanzen) differenziert werden.

2. Die mit phytopathogenen Bakterien „phagenmäßig" zusammengehörenden Bodenfluoreszenten verhalten sich im „normalen" Pathogenitätstest wie typische Saprophyten (oder avirulent gewordene pathogene Kulturen). Aus einer „statistisch-apathogenen" Population können jedoch pathogene Mutanten isoliert werden, die als Kultur eine „statistisch-pathogene" Population repräsentieren. Die Abgrenzung von parasitischen und saprophytischen Fluoreszenten wird damit zu einem populationsgenetischen Problem.

Die mitgeteilten Untersuchungsergebnisse beweisen, daß

1. die in der Systematik vorliegende „Arten"-Einteilung der phytopathogenen Pseudomonaden in ihren Grundzügen falsch ist, und daß

2. entgegen der in Lehrbüchern vertretenen Auffassung ein enger Zusammenhang zwischen parasitischen und saprophytischen Fluoreszenten besteht.

Summary

200 strains of *Pseudomonas fluorescens* isolated from soil and 150 phytopathogens belonging to different *Pseudomonas* "species" have been tested for phage sensitivity (with 65 phage types) in order to establish relational connections by comparing the sensitivity spectra. The results from phage testing may be summarized as follows:

1. A given bacteriophage is active not only against the "corresponding" bacterial strain (which has been used for the isolation of the phage) but also against many others. Its lytic activity may involve phytopathogenic and saprophytic Pseudomonads of the fluorescent type. With reference to the different "species" of the bacterial system the phage activity is unspecific.

2. A given bacterial strain may be lysed by several phage types. Despite of the fact that within the group of fluorescent Pseudomonads the number of different lysotypes is abundant distinct phytopathogenic and saprophytic bacteria may have similar sensitivity spectra (with joint phage sensitivities).

3. On the basis of phage sensitivity different "species" are as intimately connected as different isolates of a definite phytopathogenic "species".

As parasitic and saprophytic fluorescent Pseudomonads on account of their natural relationship must be regarded as representatives of a homogeneous bacterial type the pathogenicity of "phage-connected" bacteria has been investigated. The results from pathogenicity tests may be summarized as follows:

1. Different "species" of phytopathogenic fluorescent Pseudomonads have potentially the same pathogenic capabilities. They cannot be differentiated on the basis of their alleged "specific pathogenicity" (confined to definite hosts).

2. Fluorescent isolates from soil that are connected with phytopathogens by joint phage sensitivities in a "normal" pathogenicity test behave like typical saprophytes (or pathogens that have lost their virulence). However, from a "statistically avirulent" population virulent mutants can be selected which develop to a "statistically virulent" population. The connection between parasitic and saprophytic bacteria therefore represents a problem of population genetics.

The experimental results prove that

1. systematics of phytopathogenic Pseudomonads at the "species" level is wrong and that

2. contrary to textbook opinion a close relationship exists between parasitic and saprophytic bacteria of the fluorescent Pseudomonads.

Literaturverzeichnis

ADAMS, M. H., 1950: Methods of study of bacterial viruses. In: Methods in medical research, Bd. 2, 1—73. The Year Book Publishers, Inc., Chicago.

— —, 1959: Bacteriophages. Interscience Publishers, Inc., 592 pp, New York.

— —, and E. WADE, 1954: Classification of bacterial viruses: the relationship of two *Serratia* phages to coli-dysentery phages T_3, T_7 and D_{44}. J. Bact. 68, 320—325.

Ainsworth, G. C., 1948: The rules of nomenclature for microorganisms. J. gen. Microbiol. **2**, 97—102.

Allington, W. B., and D. W. Chamberlain, 1949: Trends in the population of phytopathogenic bacteria within leaf tissues of susceptible and immune plant species. Phytopathology **39**, 656—660.

Anderson, E. S., 1959: Use of phages in epidemiological studies. In: Adams, M. H., 1959 (siehe oben), S. 395—420.

— —, and R. E. O. Williams, 1956: Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. J. clin. Path. **9**, 94—127.

Ark, P. A., and M. R. Bell, 1959: Walnut blast, a new bacterial disesase of walnut. Plant Dis. Reptr. **43**, 272—275.

Beardsley, R. E., 1960: Lysogenicity in *Agrobacterium tumefaciens*. J. Bact. **80**, 180—187.

Bergey's "Manual of Determinative Bacteriology." Herausgegeben von R. S. Breed, E. G. D. Murray, and N. R. Smith, 7. Aufl., The Williams & Wilkins Co., 1094 pp, Baltimore, 1957.

Billing, E., 1960 a: An association between capsulation and phage sensitivity in *Erwinia amylovora*. Nature **186**, 819—820.

— —, 1960 b: The bacterial genera *Pseudomonas* and *Achromobacter*. Nature **188**, 25—27.

— —, J. E. Crosse, and M. E. Garrett, 1960: Laboratory diagnosis of fire blight and bacterial blossom blight of pear. Plant Path. **9**, 19—25.

Blair, J. E., and M. Carr, 1953: The bacteriophage typing of staphylococci. J. infect. Dis. **93**, 1—13.

Bortels, H. und F. Gehring, 1960: Untersuchungen über verwandtschaftliche Beziehungen zwischen einigen pflanzenpathogenen *Pseudomonas*-Stämmen unter besonderer Berücksichtigung von *Pseudomonas morsprunorum*, dem Erreger einer Steinobstbakteriose. Nachr.bl. dtsch. Pfl.schutzd., Braunschweig, **12**, 7—12.

Brinkerhoff, L. A., 1959: Variability for pathogenicity of *Xanthomonas malvacearum*. Phytopathology **49**, 534.

Burkholder, W. H., 1939: The taxonomy and nomenclature of the phytopathogenic bacteria. Phytopathology **29**, 128—136.

— —, 1954: Three bacteria pathogenic on head lettuce in New York state. Phytopathology **44**, 592—596.

— —, 1960: A bacterial brown rot of parsnip roots. Phytopathology **50**, 280—282.

— —, and M. P. Starr, 1948: The generic and specific characters of phytopathogenic species of *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. Phytopathology **38**, 494—502.

Burnet, F. M., and W. M. Stanley, 1959: The viruses. Bd. 2: Plant and bacterial viruses. Academic Press, 408 pp, New York.

Carvajal, F., 1955: Host-parasite relations with a polyvalent streptomycophage from *Streptomyces griseus*. Antibiotics and Chemotherapy **5**, 28—37.

Ceponis, M. J., and B. A. Friedman, 1959: Pectolytic enzymes of *Pseudomonas marginalis* and their effects on lettuce. Phytopathology **49**, 141—144.

Chamberlain, D. W., 1952: Variability among isolates of *Pseudomonas tabaci*. Phytopathology **42**, 4.

— —, 1956: Pathogenicity of *Pseudomonas tabaci* on soybeans and tobacco. Phytopathology **46**, 51—52.

Clark Marjorie, F. M., and A. M. Paton, 1956: A new bacterial disease of dahlias caused by *Pseudomonas marginalis*. Plant Path. **5**, 32—35.

Clayton, E. E., 1936: Water soaking of leaves in relation to development of wildfire disease of tobacco. J. agric. Res. **52**, 239—269.

Coetzee, J. N., H. C. de Klerk, and T. G. Sacks, 1960: Host-range of *Lactobacillus bacteriophages*. Nature **187**, 348—349.

Conn, H. J., E. J. Bottcher, and C. Randall, 1945: The value of bacteriophage in classifying certain soil bacteria. J. Bact. **49**, 359—373.

— —, G. E. Wolfe, and M. Ford, 1940: Taxonomic relationship of Alcaligenes species to certain soil saprophytes and plant parasites. J. Bact. **39**, 207—226.

COOK, F. D., and C. QUADLING, 1959: A modified technique for isolation of bacteriophage from contaminated materials. Canad. J. Microbiol. **5**, 311—312.

COREY, R. R., and M. P. STARR, 1957 a: Genetic transformation of colony type in *Xanthomonas phaseoli*. J. Bact. **74**, 141—145.

— —, and — —, 1957 b: Genetic transformation of streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. J. Bact. **74**, 146—150.

COSTA, A. S., J. F. DO AMARAL, A. P. VIEGAS, D. M. SILVA, C. G. TAXEIRA, and E. D. PINHEIRO, 1957: Bacterial halo blight of coffee in Brazil. Phytopath. Z. **28**, 427—444.

COWAN, S. T., 1959: Bacterial classification — Problems and developments. In: BRYSON, V., Microbiology yesterday and today. S. 54—79, Rutgers, The State University.

CROSSE, J. E., 1957: The dispersal of bacterial plant pathogens. In: HORTEN-SMITH, C., Biological aspects of the transmission of disease, S. 7—17, London.

— —, 1959: Plant pathogenic bacteria and their phages. Commonw. Phytopath. News **5**, 17—19.

DALZELL, R. C., 1957: Physiological and serological studies of members of *Erwinia, Escherichia,* and *Aerobacter*. Diss., The Pennsylvania State University, University Park, Penna. (zit. von STARR, M. P., 1959 — siehe dort).

DOWSON, W. J., 1941 a: The identification of bacteria commonly causing soft rot in plants. Ann. appl. Biol. **28**, 102—106.

— —, 1941 b: Soft-rots due to green fluorescent bacteria. Trans. brit. mycol. Soc. **25**, 215—216.

— —, 1957: Plant diseases due to bacteria. University Press, 232 pp, Cambridge, England.

DYE, D. W., 1958: Host specificity in *Xanthomonas*. Nature **182**, 1813—1814.

— —, 1959: The genus *Xanthomonas*. Commonw. phytopath. News **5**, 1—3.

EISENSTARK, A., and L. B. BERNSTEIN, 1955: Specificity of bacteriophages of *Xanthomonas pruni*. Phytopathology **45**, 596—598.

— —, S. S. GOLDBERG, and L. B. BERNSTEIN, 1955: Lysogenicity in *Xanthomonas pruni*. J. gen. Microbiol. **12**, 402—405.

ELLIOTT, CH., 1951: Manual of bacterial plant pathogens. 2. Aufl., 186 pp, Chron. bot., Waltham, Mass., USA.

ELROD, R. P., and A. C. BRAUN, 1941: A phytopathogenic bacterium fatal to laboratory animals. Science (N. S.) **94**, 520—521.

— —, and — —, 1942: *Pseudomonas aeruginosa*; its role as a plant pathogen. J. Bact. **44**, 633—644.

— —, and — —, 1947: Serological studies of the genus *Xanthomonas*. I. Cross-agglutination relationships. J. Bact. **53**, 509—518. — II. *Xanthomonas translucens* group. J. Bact. **53**, 519—524. — III. *Xanthomonas vascularum* and *Xanthomonas phaseoli* groups; the intermediate position of *Xanthomonas campestris*. J. Bact. **54**, 349—357.

ERIKSON, D., 1945: Certain aspects of resistance of plum trees to bacterial canker. I. Some biochemical characteristics of *Ps. morsprunorum* and related phytopathogenic bacteria. Ann. appl. Biol. **32**, 44.

FREEMAN, V. J., 1951: Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bact. **61**, 675—688.

FRIEDMAN, B. A., 1953: Serological tests with some phytopathogenic species of *Pseudomonas*. Phytopathology **43**, 412—414.

FUCHS, A., 1957: Bacterial canker of stone fruits. II. On the identity of *Ps. morsprunorum* and *Ps. syringae*. Plantenziekten **63**, 45—57.

FULTON, R. W., 1950: Bacteriophages attacking *Pseudomonas tabaci* and *Ps. angulatum*. Phytopathology **40**, 936—949.

GABY, W. L., 1955: Taxonomic problems relating to the identification of species within the genus *Pseudomonas*. Int. Bull. bact. Nomencl., Taxon. Iowa **5**, 153.

GALATCHIAN, P. M., 1941: Testing the pathogenicity of strains of *Bact. atrofaciens* McCull. under laboratory conditions. C. R. Ran-Sov. U. I. Lenin Acad. agric. Sci. (Moskau) **6**, 40—43.

Graham, D. C., 1958: Occurrence of soft rot bacteria in Scottish soils. Nature **181**, 61.

— —, and W. J. Dowson, 1960: The coliforme bacteria associated with potato black-leg and other soft rots. I. Their pathogenicity in relation to temperature. Ann. appl. Biol. **48**, 51—57.

Groman, N. B., 1953: Evidence for the induced nature of the change from nontoxigenicity to toxigenicity in *Corynebacterium diphtheriae* as a result of exposure to specific bacteriophage. J. Bact. **66**, 184—191.

Hayward, A. C., 1960: A method for characterizing *Pseudomonas solanacearum*. Nature **186**, 405—406.

Hedges, F., 1930: The relationship of *B. medicaginis phaseolicola* and *B. puerariae*. Phytopathology **20**, 140.

Hellmers, E., 1955: Bacterial leaf spot of African marigold (*Tagetes erecta*) caused by *Pseudomonas tagetis* sp. n. Acta agric. scand. **5**, 185—200.

Hoff, J. C., and Ch. H. Drake ,1960: Susceptibility of *Pseudomonas polycolor* to *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages. J. Bact. **80**, 420—421.

Hoffmann, G. M., 1954: Beiträge zur physiologischen Spezialisierung des Erregers des Kartoffelschorfes, *Streptomyces scabies* (Thaxt.) Waksman et Henrici. Phytopath. Z. **21**, 221—278.

— —, 1958: Untersuchungen zur Ätiologie pflanzlicher Actinomykosen. Phytopath. Z. **34**, 1—56.

Hoffmann, S., J. Kiesewalter und W. Müller, 1960: Ein Lactose-positiver Typhus-Stamm. Zbl. Bakt., I. Abt., **179**, 528—530.

Hollis, J. P., 1952: On the origin of diseases in plants. Plant Dis. Reptr. **36**, 219—227.

Israilski, W. P., 1955: Bakterielle Pflanzenkrankheiten. (Übersetzt aus dem Russischen.), 375 pp. Deutscher Bauernverlag, Berlin.

— —, and Z. S. Artemieva, 1939: Biological properties of the agent (*Bacterium mori*) of Mulberry-tree bacteriosis. Microbiologie (russ.) **8**, 888—898.

James, N., 1955: Yellow chromogenic bacteria on wheat. II. Determinative studies. Canad. J. Microbiol. **1**, 479—485.

— —, and E. B. Roslycky, 1956: Specificity of bacterial virus for *Xanthomonas trifolii*. Canad. J. Microbiol. **2**, 6—11.

Johnson, J., C. M. Slagg, and H. F. Murwin, 1924: Host plants of *Bacterium tabacum*. Phytopathology **14**, 175—180.

Jones, D., and W. J. Dowson, 1950: On the bacteria responsible for soft rot in stored potatoes, and the reaction of the tuber to invasion by *Bacterium carotovorum* (Jones) Lehmann u. Neumann. Ann. appl. Biol. **37**, 563—569.

Katznelson, H., 1950: The detection of internally-borne bacterial pathogens of beans by a rapid phage-plaque count technique. Science **112**, 645—647.

— —, and M. D. Sutton, 1951: A rapid phage plaque count method for detection of bacteria as applied to the demonstration of internally borne bacterial infections of seed. J. Bact. **61**, 689—701.

— —, and — —, 1953: Bacteriophage in relation to *Xanthomonas translucens*. Canad. J. Microbiol. **31**, 725—729.

— —, — —, and S. T. Bayley, 1954: The use of bacteriophage of *Xanthomonas phaseoli* in detecting infection in beans, with observations of its growth and morphology. Canad. J. Microbiol. **1**, 22—29.

Kelman, A., 1954: Relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. Phytopathology **44**, 693—695.

Klement, Z., 1955: A new bacterial disease of rice caused by *Pseudomonas oryzicola* n. sp. Acta microbiol. Acad. Sci. Hungaricae **2**, 265—274.

— —, 1956: Bacterial soft rot in green pepper (*Capsicum annuum*). Acta microbiol. Acad. Sci. Hungaricae **3**, 409—416.

— —, 1957: Two new bacteriophages for bacterial pathogens of the bean. Nature **180**, 41—42.

— —, 1958: *Xanthomonas vesicatoria* (Doidge) Dowson pathogenic to tomatoes in Hungary. Növenytermeles **7**, 73—78.

KLEMENT, Z., 1959: Some new specific bacteriophages for plant pathogenic *Xanthomonas* spp. Nature **184**, 1248—1249.

— —, and M. HEVESI, 1959: Occurrence of *Pseudomonas lachrymans* in Hungary and Rumania and its bacteriophage. Academia Republicii Populare Romine, Extras, S. 347—353.

— —, and B. LOVAS, 1958: Isolation and characterization of a bacteriophage for *Corynebacterium flaccumfaciens*. Phytopathology **49**, 107—112.

— —, and — —, 1960: Biological and morphological characterization of the phage for *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. Phytopath. Z. **37**, 317—325.

— —, L. LOVREKOVICH, and M. HEVESI, 1960: Studies on the biochemistry, phage sensitivity and serological properties of *Pseudomonas* pathogenic to mulberry. Phytopath. Z. **38**, 18—32.

KLINGE, K., 1959: *Pseudomonas fluorescens*, ein Boden- und Wasserkeim. III. Identifizierung von *Ps. fluorescens*-Stämmen durch Bakteriophagen. Arch. Mikrobiol. **34**, 270—284.

KNÖSEL, D., 1959: Eine neue, blattfleckenerzeugende Bakteriose an Blumenkohl. Z. Pfl.krankh. **66**, 257—263.

LACEY, M. S., 1932: Studies in baceriosis. XIX. Researches on the group of green-fluorescent bacteria, part II: On some plant diseases caused by bacteria of the green-fluorescent group, and a comparison and discussion of various cultural characteristics of certain members of this group. Ann. appl. Biol. **19**, 190—203.

LOGAN, C., 1960: Host specificity of two *Xanthomonas* species. Nature **188**, 479—480.

LOVREKOVICH, L., and Z. KLEMENT, 1960: Triphenyltetrazolium chloride tolerance of phytopathogenic bacteria. Phytopath. Z. **39**, 129—133.

LURIA, S. E., 1953: General Virology. J. Wiley & Sons, Inc., 427 pp, New York.

— —, and M. DELBRÜCK, 1943: Mutations in bacteria from virus sensitivity to virus resistance. Genetics **28**, 491—511.

LWOFF, A., 1953: Lysogeny. Bact. Rev. **17**, 269—337.

LYSENKO, O., and P. H. A. SNEATH, 1959: The use of models in bacterial classification. J. gen. Microbiol. **20**, 284—290.

MATSUMOTO, T., and N. OKABE, 1937: Preliminary note on the bacteriophage for *Bacterium citri* (Hasse) Doidge. Agric. Hortic. Japan **12**, 2055—2059.

METHA, M. M., and E. M. BERRIDGE, 1924: Studies in bacteriosis. XII. *B. pyoceaneus* as a cause of disease in lettuce and the identity of *B. marginale* with this organism. Ann. appl. Biol. **11**, 318—323.

MILLER, P. W., W. B. BOLLEN, J. E. SIMMONS, H. N. GROSS, and H. P. BARSS, 1940: The pathogen of filbert bacteriosis compared with *Phytomonas juglandis*, the cause of walnut blight. Phytopathology **30**, 713—733.

MUSHIN, R., J. NAYLOR, and N. LAHOVARY, 1959 a: Studies on plant pathogenic bacteria. I. Cultural and biochemical characters. Austr. J. biol. Sci. **12**, 223—232.

— —, — —, and — —, 1959 b: Studies on plant pathogenic bacteria. II. Serology. Austr. J. biol. Sci. **12**, 233—246.

NATALINA, O. B., I. V. VORONKEVICH, und A. I. KUTZNETSOVA, 1954: Novaia bakterial'-naia bolezn maliny. Doklady Akad. Nauk SSSR **99**, 483—484.

NEWBOLD, F. H. S., and E. H. GARRARD, 1954: Studies on actinophage for *Streptomyces scabies* (Thaxt.) Waksman and Henrici. Canad. J. Bot. **32**, 386—391.

OKABE, N., and M. GOTO, 1955: Studies on *Pseudomonas solanacearum*. X. Genetic change of the bacterial strains induced by the temperate phage T—c200. Repts. Fac. Agric. Shizuoka Univ., Japan, **5**, 57—62.

— —, and H. NAITO, 1954: Studies on *Pseudomonas solanacearum*. VII. Lysotypes of the tobacco wilt pathogens in Japan. Ebenda **4**, 61—66.

OXFORD, A. E., 1944: Production of a soluble pectinase in a simple medium by certain plant-pathogenic bacteria belonging to the genus *Pseudomonas*. Nature **154**, 271—272.

PAINE, S. G., and J. M. BRANFOOT, 1924: Studies in bacteriosis. IX. A bacterial disease of lettuce. Ann. appl. Biol. **11**, 312—317.

PATON, A. M., 1958: Pectin-decomposing strains of *Pseudomonas*. Nature **181**, 61—62.

Quadling, C., 1960 a: Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. Canad. J. Microbiol. **6**, 387—396.

— —, 1960 b: Bacteria, heredity and plant diseases. Res. Farmers, Canad. Dept. Agric., Winter 1960.

Reid, J. J., J. Naghski, R. G. Harvis, and H. D. McAuliffe, 1939: A cultural and serological study of *Phytomonas tabaci* and certain related forms. J. Bact. **37**, 234—235.

— —, — —, M. A. Farrell, and D. E. Haley, 1942: Occurrence and nature of the microorganisms associated with wildfire. Pennsylv. agric. Exp. Stat. Bull. **422**, 36 pp.

Rhodes, M. E., 1959: The characterization of *Pseudomonas fluorescens*. J. gen. Microbiol. **21**, 221—263.

Robbs, Ch. F., 1960: A new disease of the tobacco (*N. tabacum*) caused by *Ps. cichorii*. Rev. Agric. (Piracicaba) **35**, 57—61.

Rosen, H. R., and W. L. Bleeker, 1933: Comparative serological and pathological investigations of the fire-blight organism and a pathogenic, fluorescent group of bacteria. J. agric. Res. **46**, 95—119.

Sabet ,K. A., 1959: Studies on the bacterial diseases of Sudan crops. III. On the occurrence, host range and taxonomy of the bacteria causing leaf blight diseases of certain leguminous plants. Ann. appl. Biol. **47**, 318—331.

Schaeffer, P., 1958: La notion d'espèce après les recherches récentes de génétique bactérienne. Ann. Inst. Pasteur, Paris, **94**, 167—178.

Schuster, J., 1912: Zur Kenntnis der Bakterienfäule der Kartoffel. Arb. Biol. Reichsanst. **8**, 452—492.

Seleen, W. A., and C. N. Stark, 1943: Some characteristics of green-fluorescent pigment-producing bacteria. J. Bact. **46**, 491—500.

Sherris, J. C., J. G. Shoesmith, M. T. Parker, and D. Breckon, 1959: Tests for the rapid breakdown of arginine by bacteria: Their use in the identification of *Pseudomonas*. J. gen. Microbiol. **21**, 389—396.

Shimwell, J. L., and J. G. Carr, 1960: Are species of bacteria unclassifiable? Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol., Serol. **26**, 383—396.

Smale, B. C., and J. F. Worley, 1956: Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloride for obtaining pathogenic types from stock cultures of halo blight and common blight organisms. Plant Dis. Reptr. **40**, 628.

Smith, C. O., 1943: A leaf spot of *Hibiscus* spec. induced by *Phytomonas syringae*. Phytopathology **33**, 82—84.

— —, and H. J. Fawcett, 1930: A comparative study of the citrus blast bacterium and some allied organisms. J. agric. Res. **41**, 233—246.

Simth, W. K., 1958: A survey of the production of pectic enzymes by plant pathogenic and other bacteria. J. gen. Microbiol. **18**, 33—47.

Sneath, P. H. A., 1956: The change from polar to peritrichous flagellation in *Chromobacterium* spp. J. gen. Microbiol. **15**, 99—105.

Stapp, C., 1930: Bakterielle Tabakkrankheiten und ihre Erreger. Angew. Bot. **12**, 241—274.

— —, 1935: Contemporary understanding of bacterial plant diseases and their causal organisms. Bot. Rev. **1**, 405—425.

— —, 1938: Der bakterielle Erreger einer Blattfleckenkrankheit von Begonien und seine Verwandtschaft mit *Pseudomonas campestris*, dem Erreger der Adernschwärze des Kohls. Arb. Biol. Reichsanst. **22**, 379—397.

— —, 1955: Zur Pathogenität fluoreszierender Bakterien. Beitr. Biol. Pfl. **31**, 515—524.

— —, 1956: Bakterielle Krankheiten. In: Sorauers „Handbuch der Pflanzenkrankheiten", Bd. II, 6. Aufl., 2. Lief., 567 pp., Paul Parey, Berlin u. Hamburg.

— —, 1958: Pflanzenpathogene Bakterien. 259 pp., Paul Parey, Berlin u. Hamburg.

— —, 1959: Die Bedeutung bakteriologischer und serologischer Forschungen für den Pflanzenschutz. Mitt. Biol. Bundesanst., Berlin-Dahlem, Heft **97**, 1—9.

Starr, M. P., 1946: The nutrition of phytopathogenic bacteria. I. Minimal nutritive requirements of the genus *Xanthomonas*. J. Bact. **51**, 131—143. II. The genus *Agrobacterium*. J. Bact. **52**, 187—194.

Starr, M. P., 1949: III. The grampositive phytopathogenic *Corynebacterium* species. J. Bact. **57**, 253—258.

— —, 1959: Bacteria as plant pathogens. Ann. Rev. Microbiol. **13**, 211—238.

— —, and W. H. Burkholder, 1942: Lipolytic activity of phytopathogenic bacteria determined by means of spirit blue agar and its taxonomic significance. Phytopathology **32**, 598—604.

— —, and M. Mandel, 1950: The nutrition of phytopathogenic bacteria. IV. Minimal requirements of the genus *Erwinia*. J. Bact. **60**, 669—672.

— —, Z. Volcani, and D. E. Munnecke, 1955: Relationship of *Xanthomonas pelargonii* and *Xanthomonas geranii*. Phytopathology **45**, 613—617.

— —, J. E. Weiss, H. P. Klein, and Ch. S. Sisselman, 1943: Growth of phytopathogenic bacteria in a synthetic asparagin medium. Phytopathology **33**, 314—318.

St. John-Brooks, R., K. Nain, and M. Rhodes, 1925: The investigation of phytopathogenic bacteria by serological and biochemical methods. J. Path., Bact. **28**, 203—209.

Stocker, B. A. D., 1955: Bacteriophage and bacterial classification. J. gen. Microbiol. **12**, 375—381.

Stolp, H., 1956: Bakteriophagenforschung und Phytopathologie. Phytopath. Z. **26**, 171—218.

— —, 1958: Über die spontane Mutation von Phagenresistenz nach Phagensensibilität. Arch. Mikrobiol. **31**, 262—273.

— —, 1960: Über das Zusammenwirken von Bakterien und Insekten bei der Entstehung einer Geschmacksbeeinträchtigung des Kivu-Kaffees und die Rolle von Bakteriophagen bei der Aufklärung der Zusammenhänge. Phytopath. Z. **39**, 1—15.

Sutič, D., 1956: Bacterial spots on leaves of filbert. Plant Protection (Belgrad) **37**, 47—53 (jugoslawisch mit engl. Zusammenfassung).

— —, 1957: Bakteriosen an Tomaten. Posebna Izdanja Inst. Zast. Bilja (Mem. Inst. Plant Prot.) 66 pp, Beograd (jugoslawisch).

— —, and W. J. Dowson, 1959: An investigation of a serious disease of hemp (*Cannabis sativa* L.) in Jugoslavia. Phytopath. Z. **34**, 307—314.

Sutton, M. D., and H. Katznelson, 1953: Isolation of bacteriophages for the detection and identification of some seed-borne pathogenic bacteria. Canad. J. Bot. **31**, 201—205.

— —, — —, and C. Quadling, 1958: A bacteriophage that attacks numerous phytopathogenic *Xanthomonas* species. Canad. J. Microbiol. **4**, 493—497.

Thomas, R. C., 1943: The bacteriophage reaction as a means of quick identification of phytopathogenic bacteria (Abstr.). Phytopathology **33**, 1119—1120.

— —, 1945: The bacteriophage as a means of identifying bacteria. Ohio agric. Exp. Stat. Bull. **659**, 175—176.

— —, 1947: The bacteriophage reaction for the identification of bacteria. Ohio agric. Exp. Stat. Techn. Bull. **11**.

Thornberry, H. H., A. C. Braun, and R. P. Elrod, 1949: Application of the phage-lysis technique for the identification of plant pathogenic bacteria. Phytopathology **39**, 152—153.

Tsujita, M., and C. Matsui, 1955: A double lysogenic strain of *Pseudomonas solanacearum*. Proc. japan. Acad. **31**, 180—185.

Volcani, Z., 1954: An onion and tomato disease caused by a variety of *Pseudomonas syringae*. Bull. Res. Counc. Israel **4**, 171—175.

Wakimoto, S., 1954: The determination of the presence of *Xanthomonas oryzae* by phage technique. Kyushu Univ. Fac. agric. Sci., B, **14**, 495—498.

Wernham, C. C., 1948: The species value of pathogenicity in the genus *Xanthomonas*. Phytopathology **38**, 283—291.

Wormald, H., 1942: Bacterial diseases of stone fruit trees in Britain. VIII. The bacterial canker of peach. Trans. brit. mycol. Soc. **25**, 246—249.

Zachos, D. G., 1958: A spotting of olive fruits caused by *Pseudomonas savastanoi* (E. F. Smith) Stevens. Ann. Inst. phytopath. Benaki **1**, 159—170.

Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft,
Institut für Gemüsekrankheiten und Unkrautforschung,
Fischenich, Krs. Köln

Verhinderung der Kontaktübertragung des Tabakmosaik-Virus durch Magermilch[1])

Von

Alice Hein

Über die hemmende Wirkung von Milch auf Infektionen durch das Tabakmosaik-Virus (TMV) berichteten zuerst Chester (1934) und Johnson (1939, 1941). Sie prüften Milch, unter einer Anzahl anderer Substanzen, und das TMV, unter einer Anzahl anderer Viren, im Infektiositätstest. Johnson (1941) und Fulton (1943) beobachteten noch bei einer hohen Verdünnung der Milch eine mittlere Hemmwirkung; Milch mußte also sehr hemmwirksam sein. Johnson (1941) gab an, daß Magermilch und Molke ebenso wirksam wie Vollmilch sind, aufgelöste Trockenmilch und Buttermilch jedoch weniger gut wirkten.

Bawden erwog 1954 die Möglichkeit, Tabak- und Tomatensämlinge mit hautunschädlichen, virushemmenden Stoffen zu besprühen, bevor man mit ihnen arbeitete. Auch für die Anzucht und Kultur von Tomaten unter Glas, wo die Infektionsrate häufig 100 % erreicht, hielt er solche Behandlungen für möglicherweise wirksam.

Versuche zu dieser Frage wurden schon 1944 vom Cawthron-Institut, Neuseeland, und vom dortigen Tabakforschungsinstitut durchgeführt. Das Versprühen von Milch und Tannin-Lösungen ergab in Tabak-Sämlingsbeeten, in denen eine Anzahl Pflanzen mit dem TMV infiziert worden war, bei den weiteren Arbeiten einen signifikanten Schutz vor Kontakt-Infektionen (Anonym 1944). Cook (1957) berichtet später von ähnlichen Ergebnissen aus dem John Innes Horticultural Institute.

Während Crowley (1958) diese Beobachtungen bei Übertragung auf die Tomatenanzucht nicht bestätigen kann, haben die intensiveren Untersuchungen von Hare und Lucas (1959, 1960), Hare (1959), Lucas und Hare (1959) und Lucas (1959 a, 1959 b) ergeben, daß Milch und Molke die manuelle Weiter-

1) Die Untersuchungen erfolgten mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, der auch an dieser Stelle gedankt sei.

verbreitung des TMV in Tabak-, Tomaten- und Paprika-Saatbeeten, in denen infizierte Pflanzen vorhanden sind, stark reduzieren oder verhindern können.

Ausgehend von Überlegungen zum Mechanismus der Wirkung infektionshemmender Stoffe (HEIN 1961), schienen die vielerorts mit Skepsis aufgenommenen Ergebnisse von HARE und LUCAS (1959) wichtig genug, um sie — zunächst an Tomaten und mit Hilfe von Magermilch — nachzuprüfen. Es wurde versucht, die Behandlungen stärker als bei HARE und LUCAS dem in der Praxis üblichen Arbeitsverlauf anzupassen und damit ihre direkte Übertragung in die Praxis zu ermöglichen.

A. MATERIAL UND METHODEN

Handelssaatgut der Sorte „Rheinlands Ruhm" wurde, um die jeweiligen Behandlungen exakt zu ermöglichen, in drei Schalen ausgesät. Bei der Anzucht von insgesamt 1388 Pflanzen aus diesem Saatgut in Vorversuchen zu verschiedenen Terminen waren 0 bis 2 % infizierte Pflanzen festgestellt worden. Da zur Erzielung klarer Versuchsergebnisse massive Infektionsbedingungen wünschenswert erschienen, wurden 6 Pflanzen in jeder Schale nach dem Entfalten der Keimblätter (7 bis 16 Tage nach der Aussaat) mit einem 1958 von Freilandtomaten isolierten Grünstamm des TMV inokuliert. Sie wurden gekennzeichnet und dienten als Infektionsquellen. Damit war eine gleichmäßige „Ausgangsverseuchung" gewährleistet.

Die Pflanzen wurden weiterhin wie in der Praxis üblich angezogen. Aus jeder der drei Schalen wurden, einschließlich der 6 infizierten Pflanzen, 5 Tage nach der Inokulation 100 Pflanzen in Kästen pikiert, später in 8-cm-Tontöpfe getopft und schließlich in 12-cm-Tontöpfe umgetopft. In zweien der insgesamt durchgeführten vier Versuche wurden alle Pflanzen in einem vierten Arbeitsgang in größeren Abständen voneinander aufgestellt. Es ergaben sich also in zwei Versuchen drei und in zwei Versuchen vier Arbeitsgänge, bei denen die Pflanzen jeder Reihe berührt werden mußten und sich auch gegenseitig berührten.

Da gleichzeitig interessierte, in welchem Maß die durch Raucher eingetragenen Infektionen die Zahl der infizierten Pflanzen beeinflussen, wurden folgende Behandlungen angewandt:

1. Ausführung der Arbeiten ohne besondere Vorsichtsmaßnahmen (Kontrolle).
2. Hände der Arbeitskräfte und Pflanzhölzer wurden vor den jeweiligen Arbeiten mit einer Na_3PO_4-Seifenaufkochung gründlich gewaschen (Ausschaltung des „Raucher-Effektes").
3. Vor den einzelnen Arbeitsgängen wurden die Pflanzen mit frischer Magermilch tropfnaß gespritzt. Wir verwendeten dazu die 2,5 l selbsttätige Pflanzenspritze „Ideal" der Firma Holder, Metzingen.

Aussaatschalen, Pikierkästen und Töpfe waren zur Desinfektion 24 Std. in 2%ige Formalinlösung eingelegt, die Gewächshaustische mit Seifenlösung gründlich gescheuert worden. Die verwendete Komposterde war durch eine Vapam-Behandlung (400 cm^3/m^3 Erde) desinfiziert.

Frühestens 12 Tage nach dem Umtopfen der Pflanzen in 12-cm-Töpfe, ein Arbeitsgang, der an Stelle des Auspflanzens in Gewächshaus oder Freiland durchgeführt wurde, wurde jede Pflanze durch Preßsaft-Inokulation zu Einzelblättern von *Nicotiana glutinosa* auf eine eventuell erfolgte Infektion getestet. Die Pflanzen waren zu diesem Zeitpunkt 15 bis 20 cm groß. Die Prüfung der Behandlungen erfolgte in der Reihenfolge 1, 2, 3.

Die Testblätter wurden in feucht gehaltene Petrischalen eingelegt und bei etwa 25 °C und unter Dauerbeleuchtung aufgestellt (Leuchtröhren: 1 Philips Warmton TL 40 W, 2 Ergotherm rein weiß 40 W A O 15 aus 32 cm Entfernung; oder 2 Philips TLB 40 W 33 aus 38 cm Entfernung). Lokalläsionen hatten sich in den meisten Fällen bis zum zweiten Tage nach der Inokulation ausgebildet. Die Beobachtung der Blätter wurde am vierten Tage nach der jeweiligen Inokulation abgebrochen. Die Prüfung der insgesamt 300 Pflanzen jeder Serie verteilte sich gewöhnlich über einen Zeitraum von 10 bis 12 Tagen.

B. EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

1. Einfluß der Behandlungen auf die Kontakt-Übertragung

Das Ausmaß, in dem eine Sämlingspartie infiziert wird, hängt sicherlich von der Zahl der bereits in einem sehr frühen Stadium der Anzucht vorhandenen Infektionsquellen, d. h. infizierten Pflanzen, ab. Diese ersten Pflanzen können vom Samen her infiziert worden sein, die Sämlinge können sich an nicht-desinfizierten Töpfen und in TMV-enthaltender Erde infizieren, und Raucher können das Virus schon sehr früh in die Anzuchten eingetragen haben. Von ihnen aus erfolgt die Weiterverbreitung dieses hochinfektiösen Virus sehr leicht durch mechanische Übertragung beim Hantieren mit den Pflanzen oder durch den Kontakt der Blätter infizierter und gesunder Pflanzen.

a) Prüfung der Hemmwirkung bei Inokulation von Virus-Milch-Gemischen zu *Nicotiana glutinosa*

Um die Wirkung der von uns verwendeten Magermilch auf TMV-Infektionen beurteilen zu können, wurde sie in zwei Versuchen mit TMV-haltigem Tabakpreßsaft in steigender Verdünnung gemischt. Der Anteil des TMV-Preßsaftes im Inokulum betrug immer ein Zehntel. Für die Kontrollösung wurde der TMV-Preßsaft im gleichen Verhältnis mit Leitungswasser versetzt. Die Inokulation erfolgte zu je 10 Halbblättern von *Nicotiana glutinosa*.

Wie Tabelle 1 zeigt, ist — bis zu einer Verdünnung der Milch auf ein Zehntel — durch die Milchbeimischung eine Hemmung der Lokalläsionenausbildung von mehr als 90 % erzielbar. Die unverdünnt verwendete Magermilch mußte in genügendem Maße hemmwirksam sein.

b) Beeinflussung von zufälligen TMV-Infektionen durch Magermilch

Von der Hypothese ausgehend, daß die die Infektion hemmenden Substanzen eine Überempfindlichkeitsreaktion in den infizierten Zellen auslösen

Tabelle 1

Hemmung von TMV-Infektionen bei ansteigender Verdünnung der Magermilch

Anteil Magermilch im Inokulum	Anzahl Lokalläsionen		H %
	V	K	
1/2	9	194	95,4
2/5	9	214	95,8
3/10	19	237	92,0
1/5	12	316	96,2
1/10	20	200	90,0
1/20	66	239	72,4
1/30	75	221	66,1
1/40	59	196	69,9
1/50	160	190	15,8

V = Testlösung

K = Kontrollösung

H % = Prozentuale Minderung der Zahl der Lokalläsionen, errechnet aus:

$$\frac{(K-V) \cdot 100}{K}$$

und sie zum Absterben bringen (HEIN 1961), erschien es einleuchtend, daß HARE und LUCAS (1959) eine wesentlich stärkere Minderung der Zahl infizierter Pflanzen erzielten, wenn sie die Milch vor der Inokulation auf die Pflanzen brachten. Eine Milchbehandlung nach der Infektion hatte nur geringe Wirkung. Im ersten Fall ist eine wesentlich größere Sicherheit dafür gegeben, daß beim zufälligen Einbringen von Viruspartikeln bei Berührungen gleichzeitig Milch in die verletzten Zellen eindringt. In den vorliegenden Untersuchungen wurden deshalb die 100 Pflanzen der Milchreihen vor jedem Arbeitsgang, d. h. vor jedem Berühren, mit Magermilch tropfnaß gespritzt.

Die Magermilch benetzt die Blattoberflächen gut. Sie sammelt sich an den Haaren von Blattunterseiten und Stengeln in großen Tropfen. Wenn die Pflanzen tropfnaß gespritzt sind, ist eine relativ große Sicherheit gegeben, daß während des Hantierens mit diesen Pflanzen Hände und Arbeitsgeräte dauernd und gleichmäßig benetzt werden.

HARE und LUCAS (1959) haben auch durch Eintauchen der Hände in Milch eine Reduktion der Infektionen erzielt. Um Übertragungen während des Arbeitens auszuschalten, müßten die Hände dann, bevor sie eine neue Pflanze berühren, wieder in Milch getaucht werden. Das dürfte die Anzuchtarbeiten sehr komplizieren. Außerdem berühren die Pflanzen beim Austopfen auch den Arbeitstisch, sie kommen beim Aufstellen und beim Transport häufig in Kontakt mit anderen Pflanzen. Auch dadurch können Infektionen herbeigeführt werden. Der Magermilchfilm auf den Pflanzen und der Erde behindert dagegen den Ablauf der Arbeiten kaum, und die Pflanzen sind allseitig geschützt.

Den nach 8 bis 11 Wochen Kulturdauer und drei bzw. vier Arbeitsgängen erreichten Anteil an vor-infizierten, kontakt-infizierten und virusfreien Pflanzen gibt Tabelle 2 an. Da in einigen Fällen ein bis drei Pflanzen in einem Block im Verlauf der Anzucht ausfielen, ergeben sich in diesen Versuchen Dezimalbrüche und, wo diese Ausfälle die vor-infizierten Pflanzen betrafen, ein entsprechend verminderter Anteil an diesen.

Hare und Lucas (1959) haben ihre Bonituren vier Wochen nach dem Auspflanzen an Hand der bei Tabak, Tomaten und Paprika auftretenden Symptome vorgenommen. Während Tabak und Paprika bei einer vier Wochen währenden Infektion immer deutliche Symptome zeigen dürften, waren in den vorliegenden Versuchen mit Tomaten der Sorte „Rheinlands Ruhm", in denen — anders als bei Hare und Lucas — mindestens drei oder vier Infektionstermine möglich waren, nicht alle infizierten Pflanzen eindeutig zu erkennen. Die in Tabelle 2 angegebenen Werte wurden deshalb durch Inokulation von Preßsäften aus je einem Blatt jeder Pflanze zu Einzelblättern von *Nicotiana glutinosa* ermittelt.

In jedem der vier Versuche wurde zuerst die Kontrollreihe geprüft, danach die Seifenreihe und erst zum Schluß die Milchbehandlung. Während der für die Testung erforderlichen 10 bis 12 Tage wuchsen die Pflanzen weiter und berührten sich gegenseitig immer stärker. Die Milchreihen hatten dadurch immer die günstigsten Bedingungen infiziert zu werden. Trotzdem waren bei den Milchbehandlungen nur in zwei der vier insgesamt durchgeführten Versuche je zwei Pflanzen infiziert worden. In den anderen beiden Versuchen waren außer den vor-infizierten keine infizierten Pflanzen zu finden. Ob diese jeweils zwei Pflanzen wirklich durch Kontakt infiziert worden sind oder ob sie zufällig sameninfiziert waren, kann nicht entschieden werden. Es weist auch im ersteren Fall dieser geringe Anteil kontakt-infizierter Pflanzen gegen 11 bis nahe 40 % und 18 bis nahe 50 % in den Vergleichsreihen die Brauchbarkeit der Magermilchbehandlungen eindeutig aus.

Die immer höheren Anteile infizierter Pflanzen, die, entgegen den Erwartungen, in den Reihen auftraten, wo durch gründliche Reinigung von Händen und Arbeitsgeräten „Raucher-Infektionen" ausgeschaltet waren, können nur dadurch erklärt werden, daß im Verlauf der Testung infolge der verstärkten gegenseitigen Berührung durch das Weiterwachsen der Pflanzen stärkere Möglichkeiten zur Infektion als bei den Kontrollreihen bestanden, die immer zuerst geprüft wurden (s. o.). Wenn dieser verstärkte Kontakt in den Magermilchreihen nicht zu einer erhöhten Zahl infizierter Pflanzen führte, dann könnte das entweder darauf beruhen, daß die Zahl der Infektionsquellen zu diesem Zeitpunkt vergleichsweise klein war, oder daß der Magermilchfilm auf den Blättern einen längere Zeit anhaltenden Schutz vor Kontaktinfektionen gewährte.

2. Einfluß der Behandlungen auf das Pflanzenwachstum

Die auf den Blättern angetrocknete Magermilch bildet einen mehrere Wochen haftenden, glänzenden Belag, der beim Wachstum der Blätter wie ein feines Häutchen aufreißt. Es sind, wie auch bei Hare und Lucas (1959),

Tabelle 2

Einfluß der Behandlungen auf die Kontakt-Übertragung des Tabakmosaik-Virus

Ausgesät am	Getestet ab	Behandlung: Kontrolle vor-infiziert %	Kontrolle kontakt-infiz. %	Kontrolle virus-frei %	Seifenwaschungen vor-infiziert %	Seifenwaschungen kontakt-infiz. %	Seifenwaschungen virus-frei %	Magermilch vor-infiziert %	Magermilch kontakt-infiz. %	Magermilch virus-frei %
26. 8. 60*)	24. 10. 60	5,1	38,8	56,1	6,2	44,3	49,5	6,1	—	93,9
2. 11. 60**)	23. 1. 61	2,0	30,0	68,0	3,0	47,5	49,5	5,0	2,0	93,0
6. 12. 60*)	25. 2. 61	6,0	11,0	83,0	6,0	18,0	76,0	5,0	—	95,0
14. 2. 61**)	19. 4. 61	4,0	21,0	75,0	5,0	33,0	62,0	5,1	2,1	92,8

*) Drei Arbeitsgänge. **) Vier Arbeitsgänge.

Tabelle 3

Durchschnittliche Frisch- und Trockengewichte von je 20 Pflanzen

Versuch	Kontrolle Frisch-gew./Pfl. g	Kontrolle Trocken-gew./Pfl. g	Seifenwaschung Frisch-gew./Pfl. g	Seifenwaschung Trocken-gew./Pfl. g	Magermilch Frischgewicht je Pflz. g	Magermilch Frischgewicht P % ***)	Magermilch Trockengewicht je Pflz. g	Magermilch Trockengewicht P % ***)
1*)	8,6	0,8	7,6	0,7	14,3	< 0,1	1,3	< 0,1
2**)	10,9	0,9	12,1	1,0	14,4	0,6	1,2	0,8
3*)	27,3	2,8	25,8	2,8	32,9	2,5	3,1	> 5,0
4**)	23,3	2,8	26,3	3,4	36,6	< 0,1	4,0	< 0,1

*) Drei Arbeitsgänge. **) Vier Arbeitsgänge. ***) Gegenüber Kontrolle.

keinerlei phytotoxische Erscheinungen beobachtet worden. Die Pflanzen der Magermilchreihen entwickelten sich vielmehr in allen Versuchen unter unseren Bedingungen wesentlich besser als die der Kontrollreihen. Sie waren dunkler ausgefärbt und, vor allem kurz vor Abbruch der Versuche, wesentlich größer und kräftiger.

Da die Pflanzen durch den für den Einzelblattest notwendigen Zeitaufwand beim Abschluß der Versuche schon überständig waren, ist nicht anzunehmen, daß Magermilch direkt wuchsstimulierend wirkt. Die größere Wuchsfreudigkeit der milchbehandelten Pflanzen dürfte auf eine einfache Düngewirkung der Milch zurückzuführen sein.

Tabelle 3 zeigt die für jede Behandlungsart ermittelten durchschnittlichen Frisch- und Trockengewichte beim Abschluß der einzelnen Versuche. In jedem Versuch wurden aus jeder der drei Behandlungen 20 durch den Lokalläsionentest als gesund ermittelte Pflanzen dicht über der Erdoberfläche abgeschnitten,

gewogen und in Neubauerschalen bei 105 ± 1 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

In den für das Wachstum günstigen Monaten (Versuch 1 und 4) waren die Differenzen in Frisch- und Trockengewicht zwischen Magermilchbehandlungen und Pflanzen der Kontrollreihen im t-Test sehr gut zu sichern ($P < 0{,}1$ %). Auch in Versuch 2 sind die Differenzen signifikant ($P = 0{,}6$ bzw. 0,8 %). Im Versuch 3 unterschieden sich die Mittelwerte nicht wesentlich. Seine Durchführung erfolgte in den Wintermonaten, und die einzelnen Behandlungen zeigten schon in sich einen sehr ungleichmäßigen Wuchs.

Die Werte der Seifen- und der Kontrollreihen differierten nicht wesentlich. Nur in Versuch 4 war für das Trockengewicht eine schwache Sicherung der Differenz zwischen den beiden Behandlungen mit $P = 3{,}7$ % möglich. Dieser eine unter 5 % liegende Wert ist zu unsicher, als daß daraus ein Unterschied zwischen den Mittelwerten ablesbar wäre.

C. DISKUSSION

Die in Neuseeland gewonnenen Ergebnisse (Anonym 1944) und die Beobachtungen von Hare und Lucas (1959) konnten in den vorliegenden Versuchen voll bestätigt werden. Es ist möglich, mit Hilfe von Milch Kontaktinfektionen durch das TMV zu verhindern, wenn innerhalb der Saatbeete infizierte Pflanzen vorhanden sind, von denen aus eine Weiterverbreitung erfolgen könnte. Gleichzeitig werden Infektionen durch Raucher unmöglich gemacht.

Die Milch gehört wahrscheinlich, wie die meisten der bisher als hemmwirksam bekannten Substanzen, zu den Stoffen, die den Vorgang der Infektion hemmen. Bereits infizierte Pflanzen können mit ihrer Hilfe nicht virusfrei gemacht werden. Ein Sprühen nach der Infektion hatte nur geringe Wirkung (Hare und Lucas 1959). Die Milch muß deshalb wirken, wenn die Infektion gesetzt wird. Da die Verbreitung des TMV hauptsächlich beim Hantieren mit den Pflanzen erfolgt, muß die Milch also überall dort vorhanden sein, wo die Pflanzen angefaßt werden, wo sie der Arbeitsplatte aufliegen oder wo sie in Berührung mit anderen Pflanzen kommen. Die Pflanzen müssen deshalb mit einem möglichst gleichmäßigen Film von Magermilch überzogen werden, damit Gewähr gegeben ist, daß in jede Zelle, in die nach Verwundung Viruspartikeln eingetragen werden, gleichzeitig Milch mit eingebracht wird.

Die negativen Ergebnisse Crowleys (1958) sind, soweit das aus dem uns zugänglichen Referat seiner Arbeit ersichtlich ist, wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß er Milch als Therapeutikum verwandte. Er spritzte, nachdem die Infektionen gesetzt waren oder lange Zeit (14 Tage) bevor die Pflanzen ins Freiland gepflanzt wurden.

Nach Hare und Lucas (1959), Anonym (1959) und Hagborg und Chelack (1960) haben frische Vollmilch, Kondens- und Trockenmilch, die auf die Konzentration der Frischmilch gebracht wurden, und Molke die gleiche oder annähernd ähnliche infektionshemmende Wirkungen. Wahrscheinlich würde

sich noch eine Reihe anderer hemmwirksamer, nicht-phytotoxischer Substanzen für solche Behandlungen eignen, wenn sie gleich gut benetzend wirken wie die Milch. Wir sahen zunächst keinen Grund, Magermilch durch eine andere Substanz zu ersetzen, da eine bessere Wirkung kaum erzielt werden kann und sie für jedermann billig zu haben ist.

Die Versuche wurden bisher nicht auf weitere Stadien der Tomatenkultur ausgedehnt. Es fehlen deshalb Anhaltspunkte dafür, ob sich Magermilchspritzungen vor den Kulturarbeiten (Aufbinden, Geizen, Ernten) nach dem Auspflanzen in Gewächshaus oder Freiland noch in einer Minderung der Infektionen auswirken würden. Wenn jedoch die Behandlungen planmäßig bis zum Auspflanzen durchgeführt werden, so sind zu diesem Zeitpunkt vom Samen her oder über die Wurzel infizierte Pflanzen mit Sicherheit erkennbar und können eliminiert werden. Es dürften dann bei den weiteren Arbeiten keine oder nur wenige Infektionsquellen vorhanden sein und deshalb die TMV-Verbreitung wesentlich vermindert werden können.

Zumindest das zeitliche Hinausschieben der Infektionen ist durch konsequent durchgeführte Magermilchspritzungen vor jedem Arbeiten mit den Pflanzen erreichbar. Nach BOVEY, CANEVASCINI und MOTTIER (1957) kann aber ein Hinausschieben der Infektion vom 30. auf den 100. Tag, vom Tag der Aussaat an gerechnet, einen Ertragsgewinn von 5 bis 6 % für je 10 Tage bedeuten.

Es ist wahrscheinlich, daß Tabak und Paprika, wie HARE und LUCAS (1959) zeigten, sich unter den gleichen Bedingungen auch virusfrei anziehen lassen.

Inwieweit die mechanische Übertragung des Kartoffel-X-, eventuell auch des Gurkenmosaik-Virus in Gewächshäusern durch Milchbehandlungen verhindert werden könnte, bleibt nachzuprüfen. Daß die Verbreitung auch anderer Viren als des TMV beeinträchtigt werden kann, zeigen Untersuchungen mit dem Erreger des Streifenmosaiks der Gerste (SLYKHUIS 1955, HAGBORG und CHELACK 1960).

Zusammenfassung

Die Ergebnisse von HARE und LUCAS (1959) wurden in den vorliegenden Untersuchungen mit einer unverändert in die Praxis übertragbaren Methodik nachgeprüft. Sie können voll bestätigt werden.

Die Verbreitung des Tabakmosaik-Virus in Tomatenanzuchten ist bis zum Auspflanzen in Gewächshaus oder Freiland fast vollständig zu verhindern, wenn die Pflanzen vor jedem Arbeitsgang mit frischer Magermilch tropfnaß gespritzt werden. Phytotoxische Erscheinungen wurden nicht beobachtet; vielmehr scheint die Magermilch eine gewisse wachstumsfördernde, d. h. wahrscheinlich eine Düngewirkung, zu haben.

Die Ausschaltung von „Raucher-Infektionen" durch gründliches Säubern der Arbeitsgeräte und der Hände der Arbeitskräfte vor jedem Arbeitsgang machte sich, im Vergleich zur Kontrolle, nicht durch eine verminderte Zahl infizierter Pflanzen bemerkbar.

Summary

In investigations, using a method which seems to be transferable to commercial tomato growing, the results of HARE and LUCAS (1959) were fully ensured. The spread of Tobacco mosaic virus in tomato seed beds was nearly completely prevented until the tomatoes were planted into glasshouses or into the field, if the plants were sprayed with skim milk b e f o r e each handling. No phytotoxic effect was observed, rather it seemed that the skim milk stimulated the growth of the plants, probably by a manuring-effect.

The elimination of "smoker-infections" by thoroughly cleaning of hands and tools before each handling of the tomatoes did not result in a reduced rate of infected plants in comparison with control.

Literaturverzeichnis

Anonym, 1944: Mosaic investigations. 18. Ann. Rept., Dept. Sci. Ind. Res., New Zealand, 36—37.

*Anonym, 1959: 72nd Ann. Rept. Mississippi Agric. Expt. Stat. for the fiscal year ending June 30., 101.

BAWDEN, F. C., 1954: Inhibitors and plant viruses. Adv. Virus Res. **2**, 31—57.

*BOVEY, R., V. CANEVASCINI, et P. PH. MOTTIER, 1957: Influence du virus de la mosaique du tabac sur le rendement de tomates infectées à différentes dates. Rev. rom. Agric., Vitic., Arboric. **13**, 36—39.

CHESTER, K. S., 1934: Specific quantitative neutralization of the viruses of tobacco mosaic, tobacco ring-spot, and cucumber mosaic by immune sera. Phytopathology **24**, 1180—1202.

COOK, G. J., 1957: Virus in the cell. Science for everyman. New York, 145—146.

*CROWLEY, N. C., 1958: The use of skim milk in preventing the infection of glass-house tomatoes by tobacco mosaic virus. J. austr. Inst. agric. Sci. **24**, 261—264.

FULTON, R. W., 1943: The sensitivity of plant viruses to certain inactivators. Phytopathology **33**, 674—682.

HAGBORG, W. A. F., and W. S. CHELACK, 1960: Whey as an inhibitor of stripe mosaic of barley. Canad. J. Bot. **38**, 111—116.

*HARE, W. W., 1959: Milk is found useful in virus disease control. Mississippi Farm Res. **22**, 4.

— —, and G. B. LUCAS, 1959: Control of contact transmission of tobacco mosaic virus with milk. Plant Dis. Reptr. **43**, 152—154.

— —, and — —, 1960: Some effects of pH and milk on tobacco mosaic virus. Abstr. in Phytopathology **50**, 638.

HEIN, A., 1961: Untersuchungen mit einem Virushemmstoff aus Hefeextrakt. Phytopath. Z **41**, 236—256.

JOHNSON, J., 1939: Plant virus inhibitors. 3rd. Internat. Congr. Microbiol., New York, 2.—9. Sept., 100—101.

— —, 1941: Chemical inactivation and the reactivation of a plant virus. Phytopathology **31**, 679—701.

*LUCAS, G. B., 1959 a: Milk for mosaic control. Research and Farming (North Carolina Exp. Stat.) **17**, 15.

*— —, 1959 b: More about milk for mosaic control. Research and Farming (North Carolina Exp. Stat.) **18**, 13.

— —, and W. W. HARE, 1959: The inhibition of tobacco mosaic virus by proteins from bovine milk and blood serum. Abstr. in Phytopathology **49**, 544.

*SLYKHUIS, J. T., 1955: Sources of inhibitors of barley false stripe virus infection. Abstr. in Proc. canad. phytopath. Soc. **23**, 21.

* Die Arbeit war nur im Referat zugänglich.

Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Mykologie, Berlin-Dahlem

Untersuchungen über das Auftreten der *Guignardia*-Blattbräune der Roßkastanie *(Aesculus hippocastanum)* in Westdeutschland und ihren Erreger

Von

Roswitha Schneider

Mit 5 Abbildungen

An der weißblühenden Roßkastanie (*Aesculus hippocastanum*), die in Europa und Nordamerika als Straßen- und Parkbaum häufig angepflanzt wird, sind nur wenige Pilze als Krankheitserreger beschrieben worden. In phytopathologischen Lehr- und Handbüchern wird in der Übersicht über die an der Roßkastanie zu beobachtenden Schadpilze *Guignardia aesculi* (Peck) Stew. und deren Nebenfruchtformen *Phyllostictina sphaeropsoidea* (Ell. et Ev.) Petr. und *Asteromella aesculicola* (Sacc.) Petr. meist an erster Stelle genannt. Über die von diesem Pilz in USA an *Aesculus hippocastanum* und *Ae. glabra* ('Ohio buckeye') hervorgerufene und dort, besonders in den östlichen Staaten weit verbreitete Blattkrankheit ('leaf blotch') hat zuerst Stewart (1916) ausführlich berichtet. Zuverlässige Hinweise darauf, daß diese — im deutschen Sprachgebrauch als Blattbräune bezeichnete Krankheit — schon damals und in den darauffolgenden Jahrzehnten in Europa eine Rolle gespielt hat, lassen sich in der Literatur nicht finden. Trotzdem dürfte die Krankheit zumindest in Italien mit Sicherheit seit Ende des vergangenen Jahrhunderts vorhanden sein, da Saccardo bereits 1879 die *Asteromella*-Nebenfruchtform beschrieben hat. Erst in der allerjüngsten Zeit sind in der europäischen Literatur in verstärktem Maße Mitteilungen über das Auftreten der *Guignardia*-Blattbräune an *Ae. hippocastanum* gemacht worden, so aus Italien (Goidànich 1954, Scaramuzzi 1954), der Schweiz (Scaramuzzi 1954), Jugoslawien (Milatovič 1956) und Österreich (Petrak 1956). Diese Angaben lassen darauf schließen, daß die Krankheit neuerdings in Europa, offenbar zuerst in Italien, epidemisch aufgetreten und von dort aus allmählich auch nach Norden vorgedrungen ist.

Ende Juli 1960 machte H. Bortels auf eine Blattkrankheit der Roßkastanie aufmerksam, die in Bad Bertrich (Eifel) an etwa 20 bis 30 Jahre alten Bäumen stark auffiel. Bei Untersuchung der übersandten Blätter wurden auf ihnen Fruchtkörper von zwei Pyknidenpilzen gefunden, die als *Phyllostictina sphaeropsoidea* und *Asteromella aesculicola* bestimmt werden konnten. Damit war eindeutig erwiesen, daß die *Guignardia*-Blattbräune auch in Deutschland Fuß gefaßt hat. Einige Hinweise auf weitere Vorkommen dieser Krankheit an *Ae. hippocastanum* in Westdeutschland verdanke ich H. Richter und H. Umgelter. H. Richter (mündl. Mitt.) fand die *Guignardia*-Blattbräune in den Monaten September bis November 1960 in mehreren Landkreisen im Gebiet der Eifel, in Bad Neuenahr, Köln-Brühl, Bad Godesberg, Heidelberg und Freiburg (Breisgau). Von H. Umgelter (mündl. Mitt.) wird sie im Stuttgarter Raum schon seit 1958 beobachtet. Bemühungen, die Erkrankung in Braunschweig und Umgebung und in Berlin nachzuweisen, blieben ohne Erfolg. Da nach den mitgeteilten Beobachtungen ein verstärktes Auftreten von *Guignardia aesculi* in den nächsten Jahren, zumindest in Westdeutschland, nicht ausgeschlossen ist, erscheint es angebracht, auf diesen bedeutendsten Krankheitserreger der Roßkastanie an dieser Stelle hinzuweisen.

Die Krankheit wurde in Westdeutschland an den obengenannten Standorten an Bäumen jeglichen Alters beobachtet. Die befallenen Roßkastanien fielen manchmal schon aus einiger Entfernung durch die verbräunten und eingerollten Blätter auf. Gelegentlich waren auch einzelne Zweige oder Teile der Krone vorzeitig entlaubt. Das Krankheitsbild, das an Hand von übersandten Blattproben und am Standort eingehend studiert wurde, stimmt weitgehend mit dem in anderen Ländern (Stewart 1916, Petrak 1956) überein. Als Anfangssymptome zeigen sich auf den Blättern unter- und oberseits unregelmäßig begrenzte oder bandartige, rot- bis dunkelbraune Flecke, die häufig von einer leuchtendgelben bis hellbräunlichen, mehr oder minder breiten Randzone umgeben sind (Abb. 1). Die Flecke gehen meist von den Blatträndern oder den Spitzen aus, können aber auch mitten auf der Blattspreite vorkommen und sind dann häufig durch größere Blattadern begrenzt. Ihre

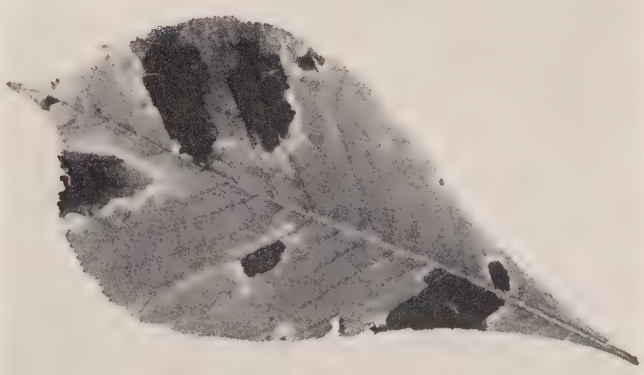


Abb. 1. Blattflecke an *Aesculus hippocastanum*, verursacht durch *Guignardia aesculi* (Peck) Stew. (etwa ½ natürl. Größe) (Bild: BBA Dahlem)

Größe schwankt zwischen wenigen Millimetern und mehreren Zentimetern. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung sind größere Teile der Blattspreite, häufig die ganzen Blättchen abgestorben, gleichmäßig rot- bis dunkelbraun verfärbt und nach oben tütenförmig eingerollt. Auf dem nekrotischen Blattgewebe sind einzelne Fruchtkörper des Pilzes als dunkle Punkte bereits mit bloßem Auge zu erkennen (Abb. 2). Ihre Anwesenheit ist das sicherste Indiz für einen *Guignardia*-Befall, da ähnliche Symptome auch bei Hitzeschäden, Wassermangel und zu Beginn des herbstlichen Abbaues des alternden Blattes auftreten können.

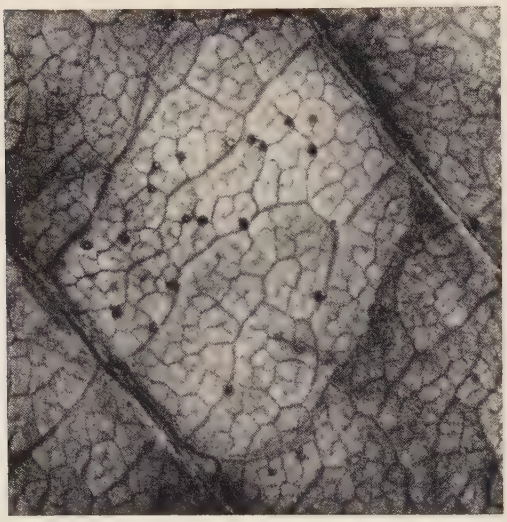


Abb. 2. Pykniden von *Phyllostictina sphaeropsoidea* (Ell. et Ev.) Petr. auf nekrotischem Blattgewebe von *Aesculus hippocastanum* (Lupenbild). (Bild: BBA Dahlem)

Bei der mikroskopischen Untersuchung von verschiedenen Befallsstadien zeigt sich, daß die drei Fruchtformen des Erregers nicht gleichzeitig gebildet werden. Im Anfangsstadium der Erkrankung und bei fortschreitender Flekkenbildung finden sich auf den lokalbegrenzten nekrotischen Stellen nur die Pykniden des *Phyllostictina*-Stadiums (Abb. 2). Erst bei totaler Blattverbräunung treten auf den abgestorbenen, oft schon am Boden liegenden Blättern (Blattspreite und -stiel) auch die Pykniden des *Asteromella*-Stadiums und vereinzelt unreife Perithezien der Hauptfruchtform auf. Da nur die beiden Nebenfruchtformen diagnostisch von Wert sind, soll zuerst auf diese eingegangen und dabei zum Teil auf die Beschreibungen von STEWART (1916) und PETRAK (1956) zurückgegriffen werden.

Phyllostictina sphaeropsoidea (Ell. et Ev.) Petr.
(syn. *Phyllosticta sphaeropsoidea* Ell. et Ev.)

Die Pykniden (Abb. 3 A) wachsen zerstreut, meist epiphyll, seltener hypophyll und nehmen das Mesophyll in seiner ganzen Breite ein. Sie sind dunkelbraun, kugelig oder schwach niedergedrückt, 80 bis 200 μ im Durchmesser und brechen nur mit der schwach kegelförmigen am Scheitel von einem rundlichen Porus durchbohrten Mündung an die Oberfläche durch. Die Pyknidenwand ist etwa 6 bis 10 μ, an der Mündung bis zu 15 μ dick. Sie besteht aus ein bis drei Lagen von unregelmäßigen oder eckigen, ziemlich stark zu-

sammengepreßten, unten und an den Seiten gelblich-bräunlichen, am Scheitel plötzlich dunkler gefärbten, fast schwarz erscheinenden Zellen. Das Innere der Pyknide wird ganz von den schleimig verklebten Sporen ausgefüllt, die an sehr kurzen, bald verschrumpfenden und verschleimenden Trägern entstehen. Die Sporen (Abb. 3 B) sind breit oval, ei- oder birnförmig, beidendig stumpf abgerundet, selten fast kugelig, einzellig, hyalin, anfangs von einem grobkörnigen Plasma erfüllt, später — bis auf einen zentralen Öltropfen — meist ohne erkennbaren Inhalt. Sie zeigen oft an einem Ende ein schwer sichtbares, gekrümmtes, hyalines Anhängsel. Die Größe der Sporen wird von Stewart (1916) und Petrak (1956) mit 10 bis 16 (bis 18) × 6 bis 10 (bis 15) μ angegeben. In den hier untersuchten Proben waren die Sporen etwas dicker. Sie maßen vom Naturmaterial 15,2 × 12,3 (13 bis 18 × 11 bis 14) μ; in Reinkulturen auf Würzeagar 15,6 × 12,4 (13 bis 21 × 10,5 bis 16) μ. Außer den *Phyllostictina*-Sporen traten in älteren Pykniden auf dem hiesigen Untersuchungsmaterial auch noch kleinere, stäbchenförmige, hyaline Mikrosporen auf, die in Gestalt und Größe völlig mit den Pyknidiosporen des *Asteromella*-Stadiums (siehe unten und Abb. 4 B) übereinstimmten. Ein entsprechender Hinweis findet sich weder in der Originaldiagnose noch in der Neubeschreibung des Pilzes als *Phyllostictina sphaeropsoidea* von Petrak (1956). Dagegen erwähnt Stewart (1916), daß gelegentlich beide Arten von Sporen, nämlich *Phyllostictina*- und *Asteromella*-Sporen, gemischt in einer Pyknide vorkommen können. Unter den üblichen Bedingungen keimten die Makrosporen der *Phyllostictina*-Pyknide zu einem sehr geringen Prozentsatz. Alle Versuche, die Mikrosporen zur Keimung zu bringen, blieben ohne Erfolg. In Reinkultur auf den gebräuchlichen Nährböden (besonders Würzeagar) und sterilisierten Kastanienblattstielen wuchs der Pilz außerordentlich langsam, fruktifizierte aber nach drei bis vier Wochen reichlich. In den Pykniden, die als schwarze, krustenförmige Überzüge die Oberfläche des Substrates bedeckten, befanden sich in einem bestimmten Reifestadium Makro- und Mikrosporen miteinander gemischt.

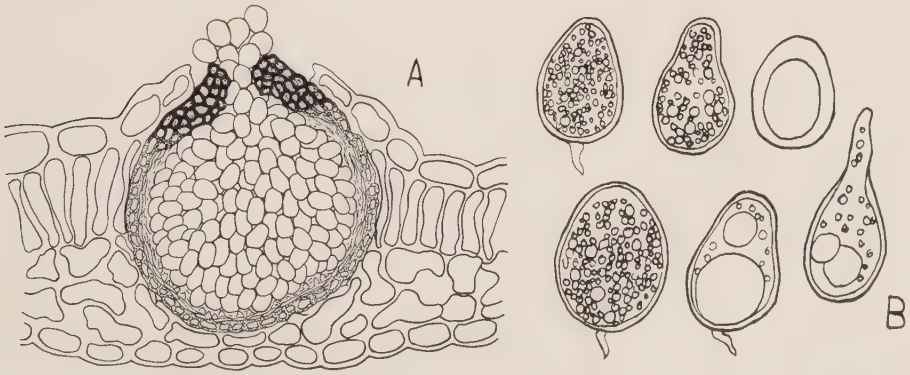


Abb. 3. *Phyllostictina sphaeropsoidea* (Ell. et Ev.) Petr.
A. Schnitt durch eine Pyknide (250 : 1).
B. Pyknidiosporen (1000 : 1) (Spore unten rechts mit Keimschlauch)

Asteromella aesculicola (Sacc.) Petr. (syn. *Phyllosticta aesculicola* Sacc.)

Die zerstreut oder in Herden meist hypophyll wachsenden Pykniden (Abb. 4 A) unterscheiden sich in Gestalt und Größe deutlich von denen des *Phyllostictina*-Stadiums (Abb. 3 A). Sie sind dem Mesophyll des Blattes eingesenkt, fast schwarz, kugelig bis eiförmig, am Scheitel von einem unscharf begrenzten, unregelmäßig-rundlichen Porus durchbohrt und erreichen einen Durchmesser von 40 bis 90 μ (auf Blattstielen bis zu 120 μ). Die Pyknidenwand ist 8 bis 10 μ, gegen den Scheitel bis zu 15 μ dick. Sie besteht aus zwei Lagen, um die Mündung aus mehreren Lagen von unregelmäßig eckigen, kaum zusammengepreßten, bräunlichen Zellen, die sich nach oben allmählich dunkler färben. Die an stäbchenförmigen Trägern oder kurzen, papillenförmig vorgezogenen Tragzellen abgeschnürten Sporen (Abb. 4B) sind stäbchen- bis knochenförmig und enthalten an den etwas verdickten Enden je einen Öltropfen. Ihre Größe in den hier untersuchten Proben schwankte innerhalb der angegebenen Grenzen zwischen 4 und 9 μ in der Länge und 1 und 2 μ in der Breite.

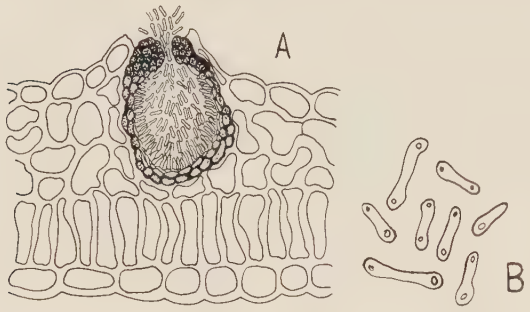


Abb. 4. *Asteromella aesculicola* (Sacc.) Petr.
A. Schnitt durch eine Pyknide (250 : 1).
B. Pyknidiosporen (1000 : 1)

Guignardia aesculi (Peck) Stew. (syn. *Laestadia aesculi* Peck)

Die Hauptfruchtform, deren Perithezien im Herbst auf den abgestorbenen Blättern angelegt werden, ist in reifem Zustande bisher nur in Nordamerika beobachtet worden (STEWART 1916). Auf einigen von H. RICHTER im Herbst 1960 in der Eifel gesammelten, stark befallenen Blättern, die in Berlin-Dahlem im Freien überwintert hatten, traten jedoch Anfang Mai 1961 sehr vereinzelt reife Perithezien einer *Guignardia* auf, die als *Guignardia aesculi* (Peck) Stew. identifiziert wurde. Sie wird wie folgt beschrieben:

Die zerstreut stehenden Perithezien (Abb. 5 A) sind niedergedrückt kugelig, oben flach und erreichen eine Größe von 100 bis 180 × 100 bis 130 μ. Eine eigentliche Mündung fehlt. Bei der Reife wird die Fruchtschicht durch Wegbröckeln der Scheitelpartie freigelegt. Die Wand besteht aus drei Lagen von polyedrischen, ziemlich dickwandigen, schwarzbraunen 4 bis 12 μ großen Zellen. Die einer flachen Basalschicht entspringenden Asci (Abb. 5 B) sind keulig, 50 bis 70 × 12 bis 17 μ groß und enthalten acht einzellige, ellipsoidische bis bohnenförmige, 13 bis 16 × 6 bis 8 μ große Sporen (Abb. 5 B) mit grobkörnigem Inhalt.

In Infektionsversuchen an Sämlingen von *Ae. glabra* ('Ohio buckeye') und *Ae. hippocastanum* mit Ascosporen von natürlich befallenen, im Freien

überwinterten Blättern, gelang es STEWART (1916), das Krankheitsbild der *Guignardia*-Blattbräune experimentell zu erzeugen. Bei diesen, in Ithaca im Staate New York in einem Gewächshaus durchgeführten Versuchen erfolgte die Beimpfung Ende Mai. Die ersten Symptome zeigten sich nach zehn Tagen. Die ersten Pykniden wurden nach drei Wochen angelegt und waren nach etwa vier Wochen reif. Auf Grund dieser Befunde und der oben mitgeteilten Beobachtungen über das Auftreten von reifen Perithezien auf Befallsproben westdeutscher Herkunft dürften auch unter den hiesigen Verhältnissen die Primärinfektionen durch Ascosporen im Verlaufe des Monats Mai erfolgen, so daß mit dem Erscheinen der Krankheit etwa von Ende Mai ab zu rechnen ist.

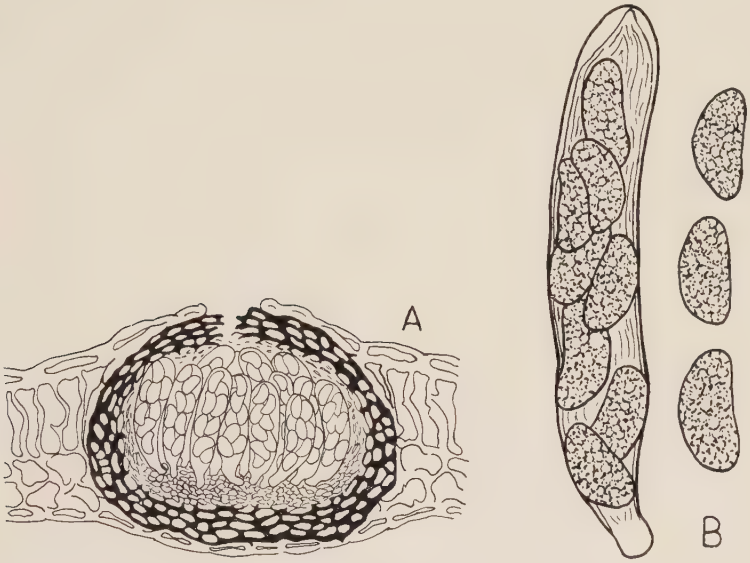


Abb. 5. *Guignardia aesculi* (Peck) Stew.
A. Schnitt durch ein Perithezium (250 : 1). B. Ascus, einzelne Ascosporen (1000 : 1)

Auf die naheliegende Frage, ob außer *Ae. hippocastanum* und *Ae. glabra* auch noch andere als Roßkastanie bezeichnete *Aesculus*-Arten und deren Bastarde von der *Guignardia*-Blattbräune befallen werden, kann eine eindeutige Antwort hier nicht gegeben werden. STEWART (1916) erwähnt, daß Infektionsversuche mit dem Blattbräune-Erreger an *Ae. parviflora (Pavia macrostachya* = 'red buckeye') negativ verlaufen seien. Soweit sich übersehen läßt, liegen weitere Untersuchungen über das Wirtsspektrum von *Guignardia aesculi* nicht vor. Auch sind Funde des Pilzes an anderen als den oben erwähnten *Aesculus*-Arten hier nicht bekannt. Beobachtungen von GOIDÀNICH (1954), PETRAK (1956) und H. RICHTER (mündl. Mitt.) aus Italien, der südlichen Steiermark bzw. Westdeutschland, daß in stark befallenen Beständen von *Aesculus hippocastanum* häufig einzelne Bäume von der Krankheit verschont bleiben und völlig gesund aussehen, lassen vermuten, daß innerhalb dieser Art offenbar widerstandsfähige Typen vorhanden sind.

Aus der Literatur geht hervor, daß die *Guignardia*-Blattbräune vornehmlich auch in Baumschulen zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führen kann, so daß Gegenmaßnahmen erforderlich werden. Nach amerikanischen Angaben sind neben Kupferkalkbrühe neuerdings auch organische Fungizide [besonders Ziram- und Zinebmittel (Davis 1948)] wirksam gewesen.

Zusammenfassung

Es wird erstmalig über das Auftreten der *Guignardia*-Blattbräune der Roßkastanie *(Aesculus hippocastanum)*, verursacht durch *Guignardia aesculi* (Peck) Stew., in Westdeutschland berichtet. Das Krankheitsbild und die verschiedenen in den Entwicklungsgang des Erregers gehörigen Fruchtformen werden beschrieben und abgebildet. Die Schlauchfruchtform, die in ausgereiftem Zustand bisher nur aus USA bekannt war, wird für Europa erstmalig nachgewiesen.

Summary

Investigations on the occurrence of *Guignardia* leaf blotch of horse chestnut *(Aesculus hippocastanum)* in Western Germany and its causal organism.

The leaf blotch of horse chestnut due to *Guignardia aesculi* (Peck) Stew. has been reported for the first time in Western Germany. The symptoms and the different stages of the pathogen are described and illustrated. The *Guignardia*, which in the mature state has been known so far only from the USA, is shown for the first time for Europe.

Literaturverzeichnis

1. Davis, S. H., 1948: Organic fungicides in the control of certain shade and ornamental tree diseases. Phytopathology **38**, 575.
2. Goidànich, G., 1954: Unusual incidence of diseases affecting economic plants in northern Italy. F. A. O. Plant Prot. Bull. **3**, 4—7.
*3. Milatović, I., 1956: Palež lisea Divljeg Kestena. (Leaf blotch of horsechestnut.) Zaštita Bilja **38**, 109—111.
4. Petrak, F., 1956: Über ein verheerendes Auftreten der Blattrollkrankheit der Roßkastanien in der südlichen Steiermark. Sydowia **10**, 264—270.
*5. Scaramuzzi, G., 1954: Sul seccume delle foglie d'Ippocastano. Ann. Sperim. agr. N. S. **8**, 1265—1281.
6. Stewart, V. B., 1916: The leaf blotch disease of horsechestnut. Phytopathology **6**, 5—19.

Die mit * gekennzeichneten Arbeiten lagen nur im Referat vor.

College of Agriculture, Plovdiv, Bulgaria

On the Role of Pyrophosphate Metabolism in the Respiratory Increase of Rust-Infected Wheat Leaves

by

K. Kristev

With one Figure

INTRODUCTION

In diseased plants, before the visible symptoms appear, biochemical alterations take place in the metabolism of the host tissues. One of the most characateristic feature of these alterations is an increased respiratory rate. This responsive reaction is extremely widespread and fungus, virus and bacterial diseases are equally characterized by an enhanced respiration of the host tissues (Rubin und Arzichowskaja 1953, Allen 1953, Farkas and Király 1958, Uritani and Akazawa 1959, Rubin 1960). Great effort has been devoted to the elucidation of the nature (pathway) of the parasitically altered respiration. A number of studies were carried out with wheat leaves infected with rust fungi. The availability of standard wheat varieties and rust races makes the results comparable and reliable. Therefore, we too have chosen the wheat-rust complex as an object of detailed studies on the effect of rust infection on some phases of the host's respiration.

The basic observations by the time we started our experiments were the following:

1. Aerobic CO_2 production is increased in infected tissues (Sempio 1950).

2. An enhanced operation of the pentose phosphate cycle seems to be responsible for the excess of CO_2 formed (Shaw and Samborski 1957, Daly, Sayre and Pazur 1957).

3. The increased respiration might play a part in the enhanced synthetic ability of infected tissues (Daly and Sayre 1957, Allen 1959, Farkas and Király 1960).

4. The stimulated respiration of rusted tissues might be based on the synthesis of a new respiratory catalyst (KAUL and SHAW 1960).

In the present paper studies on the pyrophosphate metabolism in rust-infected leaves will be reported and the results will be discussed from the point of view of the observations briefly outlined above.

MATERIALS AND METHODS

5 mg of uredospores of *Puccinia graminis tritici* Pers. were germinated in Petri dishes on distilled water. 10^{-4} M pelargon-aldehyde was added to overcome the effect of self-inhibitors (cf. FARKAS and LEDINGHAM 1959). After an incubation period of 15 hours the germinated spores were harvested and homogenized in a mortar. PP-ase activity was determined in the homogenates.

Seedlings of rust susceptible wheat varieties ("Little Club" and "Michigan Amber") were grown under ordinary greenhouse conditions. The primary leaves were inoculated by standard methods with a suspension of stem rust (*Puccinia graminis tritici* Pers.) and leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) uredospores. The reaction type given by the infected plants was 4 (STAKMAN et al. 1944). The plant material (healthy and infected) was used for the assays 10—14 days after inoculation.

Inorganic pyrophosphatase (PP-ase) was determined according to SHAEVS (1953). 1 g of plant material was homogenized in a mortar in 10 ml borate buffer containing 3 mg cysteine-HCl/ml and adjusted to pH 7.4. One ml of this homogenate was mixed with 0.1 ml 0.02 M $MgCl_2$ and 1 ml 0.2 % sodium pyrophosphate (free from inorganic phosphorus) and incubated at 25 °C for 10 minutes. After the incubation period proteins were precipitated by adding 2 ml 10 % trichloracetic acid. The solution was filtered and the amount of inorganic phosphorus was determined in the filtrate by the Fiske-Subarrow method. The inorganic phosphorus content of extracts treated with trichloracetic acid at the start of the experiment was also determined (control). The difference between control and experimental samples was regarded as a measure of PP-ase activity. The data are calculated on a dry weight basis.

RESULTS

The activity of PP-ase in infected plants was measured at different pH values. As may be seen from table 1, the highest activity was found at pH 7.4. Therefore, we are apparently dealing with alcaline pyrophosphatase (cf. NAGANNA, VEMCOPAL and SRIPATHI 1954). Alcaline inorganic pyrophosphatase is greatly activated by Mg^{++}-ions (cf. SUMNER and SOMERS 1953). As seen in table 2, in line with the observations referred to above, no PP-ase activity was found in extracts of rust infected wheat leaves without Mg^{++}-ions.

It has been reported that the activity of alcaline pyrophosphatase is augmented in the presence of glutathione (cf. SUMNER and SOMERS 1953). Instead of glutathione we used cysteine with the same result (table 3). According to NAGANNA, VEMCOPAL and SRIPATHI (1954) alcaline pyrophosphatase is strongly inhibited by NaF. The pyrophosphatase of rusted wheat leaves was also sensitive to NaF (table 4). All these observations support the suggestion made above that the enzyme extracted from rust infected wheat is alcaline pyrophosphatase.

Table 1

The activity of inorganic pyrophosphatase in rust infected wheat leaves by differenc pH value

pH value	Activity*)
4	0.4
5	8
5.5	18
6.5	50
7.4	54
8.5	9.5

*) γ inorganic phosphorus released by 100 mg dry weight tissue in 10 minutes at 25 °C.

Table 2

Effect of Mg^{++} on the activity of alcaline pyrophosphatase in rust infected wheat leaves

pH	Activity*)	
	Control	+ 10 μM Mg^{++}
7.4	6.0	34.8

*) γ inorganic phosphorus released by 100 mg dry weight tissue in 10 minutes at 25 °C.

In further studies the pyrophosphatase activity of healthy and rusted leaves was compared. It has been found that by the time of the great respiratory increased of rust-infected leaves the PP-ase activity is also dramatically enhanced. A number of representative experiments are shown in table 5.

Table 3

The influence of Cystein on the alcaline pyrophosphatase activity in rust infected wheat leaves

pH	Activity*)	
	Control	+ 175 μM Cystein
7.4	2.8	20.7

*) γ inorganic phosphorus released by 100 mg dry weight tissue in 10 minutes at 25 °C.

Table 4

The inhibitory effect of M/1000 NaF upon the PP-ase activity in rust infected wheat leaves

pH	Activity*)	
	Control	NaF + M/1000
7.4	45.6	2.2

*) γ inorganic phosphorus released by 100 mg dry weight tissue in 10 minutes at 25 °C.

To find out whether or not a correlation exists between PP-ase activity and respiratory rate in rusted tissues the O_2-consumption and PP-ase activity

of infected wheat leaves was measured every 2 days after infection. As shown in fig. 1 there is a definite parallelism between the processes which seems to support of causal connection.

The presence of PP-ase activity was found in germinating uredospores. Further studies are needed to show in how far the fungal enzyme is responsible for the increased PP-ase activity of rusted leaves.

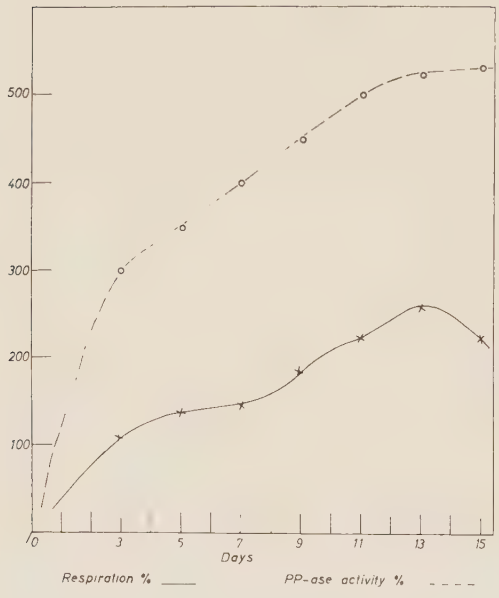


Fig. PP-ase activity and respiratory rate in infected tissue

Table 5

Experiments for the PP-ase activity in rust infected wheat leaves, 10—12 days after infection

pH	Activity*)
7.4	infected 29.6 healthy 5.4 infected 54 healthy 9.5 infected 58 healthy 11

*) γ inorganic phosphorus released by 100 mg dry weight tissue in 10 minutes at 25 °C.

DISCUSSION

The highly augmented alcaline PP-ase activity in rust-infected wheat leaves may play a role in a number of metabolic processes. One of the roles of PP-ase is the splitting of inorganic pyrophosphate, a well known inhibitor of several enzyme systems: phosphoglucomutase (SLEIN and MILTON 1955), aldolase (CHRISTIAN 1955), hexokinase (ROUX et al. 1955), isocitric dehydrogenase (OCHOA 1955), on the acetylation of P-aminobenzoic acid (NASHKOV and NASHKOVA 1960). Since there is no indication of inhibition of enzymes in the healthy wheat tissues we cannot attribute significance to PP-ase in overcoming enzyme inhibition and thereby regulating respiratory rate.

PP-ase certainly plays a role in equilibrium reaction where ATP participates and inorganic pyrophosphate is one of the end products. If the equilibrium is unfavourable for synthesis, the hydrolysis of the pyrophosphate formed can drive the reaction to completion:

$$\text{enzyme} + \text{ATP} \rightleftarrows \text{enzyme} - \text{AMP} + \text{PP}.$$

Therefore, pyrophosphatase is recently successfully used in vitro to accelerate reactions connected with pyrophosphatase synthesis (Robins and Lipmann 1956, Cantoni and Durell 1957).

In the living plant a number of synthetic processes are associated with PP-formation, such as amine acid activation (cf. Hoffmann-Ostenhof 1960), synthesis of uridine nucleotides (cf. Hoffmann-Ostenhof 1960), synthesis of DPN (Kornberg 1950) and FAD (Schrecker and Kornberg 1950), activation of acetate (Johns et al. 1953), sulfate (Bandurski et al. 1956), carbon dioxide (Bachhawat and Coon 1958) and all these processes might be accelerated by increased pyrophosphatase activity. The stimulation of synthetic reactions is characteristic for a number of diseased tissues (Allen 1959, Uritani and Akazawa 1959, Farkas and Király 1960) and these reactions, consuming ATP, might play a role in the regulation of respiratory rate. Increased PP-ase activity might partly stimulate some of these reactions and also liberate inorganic phosphorus claimed to be necessary for the maximal speed of respiration (cf. Goddard and Bonner 1960).

The enhanced splitting of inorganic pyrophosphate in diseased tissues might play a role in the regulation of the respiratory pathway as well. The pentose phosphate shunt is activated in diseased tissues (Shaw and Samborski 1957, Daly and Sayre 1957) and for its continuous operation a catalyst is needed to keep TPN in oxidized state. This might be an ascorbic system (Király and Farkas 1957) or a flavine nucleotide. As shown by Clayton (1959) FMN is necessary for the maximal operation of pentose cycle enzymes in tobacco extracts. As the synthesis of FMN is favoured by the breakdown of pyrophosphate it seems possible that the increased pyrophosphatase activity in rusted leaves promotes the synthesis of the necessary catalyst. The recent results of Kaul and Shaw (1960) on the changes of redox systems in rust-infected wheat leaves can also be best interpreted by the synthesis of a new catalyst which would favour the pentose phosphate pathway.

The increased PP-ase activity, therefore, is apparently involved both in the regulation of the overall respiratory rate and in that of the respiratory pathway.

Part of this work was carried out in the Research Institute for Plant Protection, Budapest. Thanks are due to Dr. G. L. Farkas for his valuable suggestions during the work.

Summary

The activity of alcaline inorganic pyrophosphatase was measured in healthy and rust-infected wheat leaves. It has been found that the activity of pyrophosphatase is increased by about 500 per cent in the diseased tissues. Simultaneously the respiratory rate is also enhanced. The role of stimulated pyrophosphatase activity in the diseased tissues is dicussed from the point of view of the altered metabolic pathways in rust-infected wheat.

Zusammenfassung

Die Aktivität der alkalischen Pyrophosphatase wurde in gesunden und rostbefallenen Weizenblättern bestimmt. Es wurde gefunden, daß die Pyrophosphataseaktivität in den kranken Geweben um 500 % erhöht wird. Gleichzeitig steigt die Atmungsintensität der infizierten Gewebe an. Die Rolle der erhöhten Pyrophosphataseaktivität in den kranken Blättern wird unter dem Gesichtspunkt der veränderten Stoffwechselwege beim rostbefallenen Weizen diskutiert.

Literature cited

ALLEN, P. I., 1953: Toxins and tissue respiration. Phytopathology **43**, 221.

— —, 1959: Metabolic consideration of obligate parasitism. In "Plant Pathology", Problems and Progress 1908—1958. Edited by C. S. HOLTON et al. The University of Wisconsin Press. Madison 119—130.

BACHHAWAT, B. K., and M. I. COON, 1958: Enzymatic activation of carbon dioxide. I. Cristalline carbon dioxide — activating enzyme. J. biol. Chem. **231**, 625—635.

BANDURSKI, R. S., L. G. WILSON, and C. L. SQUITES, 1956: The mechanism of"active sulfate" formation. J. amer. chem. Soc. **78**, 6408—6409.

CANTONI, C. L., and I. DURELL, 1957: Activation of methionine for transmethylation. II. The methionine — activating enzyme. Studies on the mechanisme of the reaction. J. biol. Chem. **225**, 1033—1048.

CHRISTIAN, W., 1955: Aldolase from yeast. In "Methods in Enzymology" vol. I. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan. Academic Press. New York 315—320.
respiratory pathway during sporulation of rust of safflower. Plant Physiol. **52**, 44—48.

CLAYTON, R. T., 1959: Pentose cycle activity in cell free extracts of tobacco leaves and seedlings. Arch. Biochem., Biophys. **79**, 111—123.

DALY, D. M., and R. M. SAYRE, 1957: Relation between growth and respiratory metabolism in safflower infected by *Puccinia carthami*. Phytopathology **47**, 163—168.

— —, — —, and O. H. PAZUR, 1957: The hexose monophosphate shunt as the major respiratory pathway during sporulation of rust of safflower. Plant Physiol. **52**, 44—48.

FARKAS, G. L., and Z. KIRÁLY, 1958: Enzymological aspects of plant disesases. I. Oxidative enzymes. Phytopath. Z. **31**, 251—272.

— —, and — —, 1960: Amide metabolism in wheat leaves infected with stem rust (in press).

— —, and G. H. LEDINGHAM, 1959: The relation of self inhibition of germination to the oxidative metabolism of stem rust uredospores. Canad. J. Microbiol. **5**, 141—150.

GODDARD, R. D., and W. D. BONNER, 1960: Cellular respiration 229. In "Plant Physiology" vol. I. Edited by F. S. Steward.

HOFFMANN-OSTENHOF, O., 1960: Transferases. Ann. Rev. Biochem. **29**, 63—104.

JOHNS, M. E., K. LIPMANN, H. HILZ, and F. LYNEN, 1953: On the enzymatic mechanism of coenzyme A acetylation with adenosintriphosphate and acetate. J. amer. chem. Soc. **75**, 3285—3286.

KAUL, R., and M. SHAW, 1960: The physiology of host — parasite relations VI. Oxidation — reduction changes in wheat leaf sap caused by rust infection. Canad. J. Bot. **38**, 399—407.

KIRÁLY, Z., and G. L. FARKAS, 1957: On the role of ascorbic oxidase in the parasitically increased respiration of wheat. Arch. Biochem., Biophys. **66**, 474—485.

KORNBERG, A., 1950: Reversible enzymatic synthesis of diphosphopiridine nucleotide and inorganic pyrophosphate. J. biol. Chem. **182**, 779—793.

NAGANNA, B., B. VEMCOPAL, and C. E. SRIPATHI, 1954: Pyrophosphatase in plants during growth. Nature **174**, 593.

Nashkov, D., and O. Nashkova, 1960: The influence of sodium pyrophosphate upon the acetylation of p-aminobenzoic acid. Enzymologya **21**, 380—384.

Ochoa, S., 1955: Isocytic dehydrogenase system (TPN) from pig heart in "Methods in Enzymology" vol. I. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan. Academic Press. New York 699—704.

Robins, P. W., and F. Lipmann, 1956: The enzymatic sequence in the biosynthesis of active sulfate. The mechanism of "active sulfate formation". J. amer. chem. Soc. **78**, 6409—6411.

Roux, H., et al., 1955: III Congress Int. Biochem. Bruxelles. Résumé de Communication, 30.

Rubin, B. A., 1960: Respiration and its role in plant immunity. Academic Press Moscow 1—66 (russ.).

— —, und E. V. Arzichowskaja, 1953: Biochemische Charakteristik der Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegenüber Mikroorganismen. Akademie Verl. Berlin 1—87.

Schrecker, A. W., and A. Kornberg, 1950: Reversible enzymatic synthesis of flavinadenine dinucleoside. J. biol. Chem. **182**, 795—803.

Sempio, C., 1950: Metabolic resistance to plant diseases. Phytopathology **40**, 799—822.

Shaevs, G. C., 1953: The effect of denervation and tenotomi on the activity of Pyrophosphatase and adenosintriphosphatase. Biochimija **1**, 63—70 (russ.).

Shaw, M., and D. J. Samborski, 1957: The physiology of host — parasite relation. III. The pattern of respiration in rusted and mildewed cereal leaves. Canad. J. Bot. **35**, 389—407.

Slein, N., and W. Milton, 1955: Phosphohexoisomerases from muscle, in "Methods in Enzymology" vol. I. Edited by Sidney P. Colowick and Nathan O. Kaplan. Academic Press. New York, 299—306.

Stakman, E. C., et al., 1944: Identification of physiologic races of *Puccinia graminis tritici* 1—26. US Dept. Agric., Agric. Res. Stat., Bur. Ent., Plant Quarant., E — 617.

Sumner, I. B., and G. F. Somers, 1953: Chemistry and Methods of Enzymes. 3rd. Ed. Academic Press. New York, 1—46.

Uritani, O., and Akazawa, 1959: Alteration of the respiratory pattern in infected plants. In „Plant Pathology", edited by J. C. Horsfall and A. E. Dimond, Academic Press, New York, vol. I, 312—390.

Aus dem College of Agriculture und Research Institute, Potchefstroom, Republic of South Africa

Das Schicksal von Antibiotika in Tomatenpflanzen

I. Methoden zur Bestimmung von Antibiotika in Pflanzen

Von

W. Krüger[1])

Mit 9 Abbildungen

EINLEITUNG

Die Aufnahme von Antibiotika durch die Wurzeln und deren Weiterleitung in die oberirdischen Teile wurde schon bei vielen Pflanzenarten beschrieben. Diese Aufnahme und Weiterleitung ist sehr spezifisch und muß für jedes Antibiotikum und jede Pflanzenart bestimmt werden, wie aus einer Zusammenstellung von Crowdy u. Pramer (1955) hervorgeht.

In der vorliegenden Publikationsserie werden im Teil I und II Daten über Testmethoden der Antibiotika sowie deren Aufnahme, Transport und Stabilität in Tomatenpflanzen gegeben. Im Teil III werden Versuche besprochen, in denen die Aufnahme und die Aktivität von Antibiotika durch Wuchsstoffe erhöht werden sollte.

Die quantitative Bestimmung der Antibiotika erfolgte in einleitenden Versuchen biologisch mit der Papierblättchenmethode, aber da mit dieser Methode Schwierigkeiten gefunden und weil außerdem Adsorption und Wirkungssteigerung der Antibiotika beobachtet wurden (Krüger 1957), war es ratsam, die Methodik weiter auszuarbeiten.

MATERIAL UND METHODEN

Die Versuche wurden mit der Tomatenvarietät „Hugo" ausgeführt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus gezogen und bei einer Höhe von etwa 15 cm ausgetopft. Nachdem die Wurzeln gewaschen waren, wurden diese für eine bestimmte Zeit in die Antibiotikalösung getaucht. Danach wurden die Pflanzen entweder sofort analysiert oder aber erst nach einer gesetzten Periode. In der Zwischenzeit waren die Tomaten wieder eingetopft.

[1]) Anschrift des Verfassers: Kiel, Blücherplatz 1 — Deutschland.

Die folgenden Antibiotika wurden verwendet:

Antibiotika:	Zur Verfügung gestellt von:
Agrimycin 100 (Streptomycin + Terramycin = 15% + 1,5%)	Pfizer & Company
Bacitracin, 55 E/mg	Pfizer & Company
Chloramphenicol (Chloromycetin)	Parke, Devis, Johannesburg
Chlortetracyclin (Aureomycin)	Lederle Laboratories
Endomycin	Upjohn Company
Erythromycin (Ilotycin)	Lillys Company
Novobiocin (Albamycin)	Upjohn Company
Oleandomycin (Romicil-Roche)	Roche-Products
Oxytetracyclin (Terramycin)	Pfizer & Company
Penicillin G, 1580 E/mg	Bayer-Werke
Streptomycin-sulfat, 740 E/mg	Bayer-Werke
Thiolutin, 1000 E/mg	Pfizer & Company
Vancomycin-HCl, 1510 E/mg	Lillys Company

Die Konzentration der Antibiotikalösungen oder die von Antibiotika in Pflanzen wurde biologisch mit der Lochmethode mit den folgenden Bakterien bestimmt:

	Inkubation bei °C
Bacillus cereus/ATCC 10701	29
Bacillus circulans/ ATCC 9966	29
Bacillus pumilus	29
Bacillus subtilis/ATCC 1262	33
Corynebacterium michiganense	29
Escherichia coli/Typ III	33
Sarcina lutea/ATCC 9341	29
Staphylococcus aureus/ATCC 6538 P, str. 209 P	35

Die Bakterien wurden 24 Stunden auf Bouillonagar (Difco-nutrient agar) kultiviert und dann in 0,83%iger NaCl-Lösung suspendiert. Diese Suspension wurde im KLETT-SUMMERSON photoelektrischen Kolorimeter mit Blaufilter auf eine optische Dichte von 0,180 eingestellt, um eine zu große Fluktuation in der Anzahl der Bakterien in nacheinander folgenden Untersuchungen zu vermeiden. Die Bakteriendichte ist nämlich ein Faktor, der die Größe der Hemmradien beeinflussen kann (DE BEER u. SHERWOOD 1945, LINTON 1958).

Von dieser Suspension wurden 0,5 ml in 100 ml Agar von 46 bis 48 °C pipettiert. Von dem infizierten Agar wurden 10 ml in Petrischalen gegeben, die schon vorher eine 10-ml-Lage nicht infizierten Agar erhalten hatten. Die Petrischalen wurden über Nacht im Eisschrank bei 3 bis 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurden mit einem 10-mm-Korkbohrer Löcher in die Agarplatten gestanzt und 0,1 ml Saft oder Wasser je Loch pipettiert.

Nach der Beschickung der Agarplatten mit der Testflüssigkeit wurden diese für 22 Stunden bebrütet. Die Hemmzonen wurden mittels Schublehre bis zu einer Genauigkeit von 0,1 mm gelesen.

Nachdem die Tomatenpflanzen gewaschen und abgetrocknet waren, wurde der Saft durch Auspressen mittels einer Handpresse gewonnen und 1/2 bis 1 1/2 Stunden im Eisschrank bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

Bevor die Lochmethode Verwendung fand, wurde die Papierblättchenmethode, die allgemein in medizinischen und biologischen Prüfungen gebraucht wird und auch von MITCHEL, ZAUMEYER u. PRESTON (1954) für die Analyse von Bohnen verwendet wurde, auf ihre Brauchbarkeit geprüft. Die Ergebnisse dieser Prüfung werden im ersten Abschnitt unter „Resultate" besprochen werden.

Ein Nachteil der biologischen Methode ist, daß nur die Aktivität einer gewissen Substanz bestimmt wird. Ob diese Substanz die ursprünglich applizierte ist, kann schwer entschieden werden. Nur wenige Untersuchungen sind in dieser Richtung hin ausgeführt worden, und deren Resultate deuten auf eine mögliche Umformung der Antibiotika in der Pflanze hin. Trotz einer Änderung können die Antibiotika aber aktiv bleiben (WELLES, ANDERSON u. CHENN 1955) oder sogar größere Aktivität erhalten (GRAY 1958, LEMIN u. MAGEE 1957).

Mit Hilfe chemischer und papierchromatographischer Methoden war es auch möglich, dieselben oder zumindest sehr nahe verwandte Substanzen zu bestimmen. MEHTA, GOTTLIEB u. POWELL (1959) analysierten Vancomycin, PRAMER (1953) Streptomycin und Chloramphenicol, WALLEN u. MILLAR (1957) Cycloheximid und CROWDY, GARDNER, GROVE u. PRAMER (1955) Griseofulvin und Chloramphenicol in Pflanzen.

Auch quantitative Antibiotikabestimmungen verglichen gut zwischen der biologischen und chemischen Methode (CROWDY et al. 1955 und CROWDY 1957). CROWDY u. PRAMER (1955 a) fanden aber auch größere Griseofulvinmengen im Chloroformextrakt als mit der biologischen Analyse und führten dieses auf die völlige Extraktion des Antibiotikums zurück. Mit der biologischen Methode wurde nur der aktive Anteil erfaßt.

Auf Grund des oben Gesagten sind alle biologischen Prüfungen mit einem gewissen Unsicherheitsfaktor belastet, der noch nicht eliminiert werden konnte. Die erhaltenen Werte spiegeln daher nicht die „Konzentration" des betreffenden Antibiotikums wieder, obwohl der Ausdruck gebraucht werden wird, sondern vielmehr dessen „Aktivität".

RESULTATE

1. Brauchbarkeit der Papierblättchenmethode für die Analyse von Streptomycin in Tomatenpflanzen

Die Brauchbarkeit der Blättchenmethode für die Bestimmung von Antibiotikakonzentrationen ist außer Frage, sofern reine Lösungen oder wenig verunreinigtes Material geprüft werden. Wird kontaminiertes Medium analy-

siert, wie es mit Pflanzensaft der Fall ist, dann können Komplikationen erwartet werden. Sehr oft entwickeln sich Bakterien um die Scheiben, wenn Saft unbehandelter Pflanzen appliziert wird oder wenn das Antibiotikum gegen die verunreinigenden Bakterien im Saft nicht wirksam ist. In dem zuletzt genannten Falle spielt eine von diesen Bakterien überwachsene Fläche keine Rolle, wenn die Hemmzone des Testbakteriums größer als die überwucherte Fläche ist.

Um das Wachstum der verunreinigenden Bakterien zu vermeiden, fügten Mitchell et al. (1954) 0,1%ige $HgCl_2$-Lösung dem Saft von Bohnen im Verhältnis von 1 Teil $HgCl_2$-Lösung zu 9 Teilen Saft zu. Dieselbe Methode wurde auch für Tomaten geprüft.

Pflanzen einer Größe von 15 bis 20 cm wurden im Starmix homogenisiert und deren Saft durch Auspressen des Breies durch ein Leinentuch gewonnen. Saft von Blättern und Stengel wurde gesondert gehalten. Eine Saftprobe wurde für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert, eine andere wurde nicht behandelt. Zur supernatanten Flüssigkeit bzw. zur unbehandelten Probe wurde dann die $HgCl_2$-Lösung pipettiert. Die Ergebnisse mit vier Bakterien sind in Tabelle 1 angegeben .

Tabelle 1 zeigt, daß die Konzentration von 0,2 % für alle Testbakterien zu stark war, wenn zu Saft von Stengeln gegeben. Wurde das Zentrifugat beschickt, so schien die Wirkung des Quecksilberchlorids bei einigen Bakterien sogar noch erhöht.

Saft von Blättern inaktivierte mehr $HgCl_2$, und keine Hemmzonen wurden durch irgendeine $HgCl_2$-Konzentration verursacht. Wenn *E. coli, B. pumilus* und *S. aureus* verwendet wurden, entwickelten sich aber die nicht erwünschten kontaminierenden Bakterien um die Scheiben, und zwar bevorzugt bei den niedrigen Konzentrationen von 0,1 und 0,05 % $HgCl_2$. Eine Ausnahme bildete *S. lutea*. Dieses Bakterium ließ kein sekundäres Bakterienwachstum zu, selbst wenn kein $HgCl_2$ appliziert worden war. Da *S. lutea* jedoch nicht gegen alle Antibiotika sensitiv war, konnte auf Grund der günstigen Resultate in bezug auf die Unterdrückung sekundären Bakterienwachstums diese Blättchenmethode nicht empfohlen werden. Der arbeitsreicheren Lochmethode wurde der Vorzug gegeben, weil Unsicherheitsfaktoren weniger markant waren. Der Saft wurde auch weder zentrifugiert noch mit $HgCl_2$ beschickt. Die Agarplatten wurden sehr selten von Bakterien überwachsen.

In diesem Zusammenhang kann noch erwähnt werden, daß Zentrifugieren die Streptomycinaktivität verminderte. Streptomycin wurde zu Saft von Stengeln und Blättern und zu Wasser gegeben. Eine Serie wurde für 15 min bei 3000 rpm zentrifugiert, die andere nicht. Der Saft wurde mit *B. pumilus* und *E. coli* auf Aktivität geprüft. Die Resultate sind in Tabelle 2 angegeben.

Zentrifugieren verminderte die Aktivität gegen beide Bakterien. Die Abnahme war aber nur geringfügig. Die Zahlen in Tabelle 2 zeigen ebenfalls, daß die Hemmzonen größer wurden, wenn Streptomycin in Saft gelöst und wenn *B. pumilus* Testbakterium war. Einzelheiten über Aktivitätssteigerung siehe Krüger (1957).

Tabelle 1

Die Wirkung von $HgCl_2$-Lösung
auf die den Pflanzensaft kontaminierenden Bakterien
und auf die Testbakterien im Agar
(Hemmzonen in Zentimeter angegeben)[z])

Geprüftes Material	Konzentration der $HgCl_2$-Lösung			
	0,2 %	0,1 %	0,05 %	0,00 %
	Bacillus pumilus			
Wasser	0,67	0,04	0,0+	0,00
Saft von Stengeln				
Nicht zentrifugiert	0,04	0,02	0,00	0,00[y])
Zentrifugiert	0,09	0,02	0,0+	0,00
Saft von Blättern				
Nicht zentrifugiert	0,00	0,00	0,00[x])	0,00[y])
Zentrifugiert	0,00	0,00	0,00	0,00[y])
	Escherichia coli			
Wasser	0,71	0,45	0,06	0,00[y])
Saft von Stengeln				
Nicht zentrifugiert	0,57	0,07	0,00[x])	0,00[x])
Zentrifugiert	0,71	0,37	0,00[x])	0,00[x])
Saft von Blättern				
Nicht zentrifugiert	0,00	0,00[x])	0,00[x])	0.00[x])
Zentrifugiert	0,00	0,00[y])	0,00[y])	0,00[x])
	Staphylococcus aureus			
Wasser	0,71	0,24	0,01	0,00
Saft von Stengeln				
Nicht zentrifugiert	0,63	0,06	0,01	0,00[y])
Zentrifugiert	0,57	0,10	0,00	0,00[y])
Saft von Blättern				
Nicht zentrifugiert	0,00[y])	0,00[y])	0,00[x])	0,00[x])
Zentrifugiert	0,00	0.00	0,00[y])	0,00[y])
	Sarcina lutea			
Wasser	0,88	0,30	0,0+	0,00
Saft von Stengeln				
Nicht zentrifugiert	0,59	0,02	0,00	0,00
Zentrifugiert	0,52	0,03	0,0+	0,00
Saft von Blättern				
Nicht zentrifugiert	0,00	0,00	0,00	0,00
Zentrifugiert	0,00	0,00	0,00	0,00

[x]) Wachstum kontamierender Bakterien um ganze Papierscheibe.
[y]) Wachstum kontamierender Bakterien um Teile der Papierscheibe.
+) Nicht meßbare Hemmung.
[z]) Mittelwert von vier Hemmzonen.

Tabelle 2

Einfluß des Zentrifugierens von Pflanzensaft auf die Aktivität von Streptomycin, gemessen am Durchmesser der Hemmzonen in Zentimeter*)

Testorganismen	Behandlung	Art des Lösungsmittels der Antibiotika											
		Saft von Blättern				Saft von Stengeln				Wasser			
		Verwendete Konzentrationen in E/ml											
		100	50	10	0	100	50	10	0	100	50	10	0
Bacillus pumilus	Zentrifugiert	1,47	1,35	0,71	0,00	1,41	1,41	0,96	0,00	—		—	–
Bacillus pumilus	Nicht zentr.	1,52	1,39	0,75	0,00	1,53	1,40	1,00	0,00	1.16	1,07	0,72	0,00
Escherichia coli	Zentrifugiert	0,93	0,63	+	0,00	1,08	0,85	+	0,00	—	—	—	—
Escherichia coli	Nicht zentr.	1,06	0,72	+	0,00	1,14	0,96	0,28	0,00	1,14	0.89	0,53	0,00

\+ Nichtmeßbare Hemmung.
*) Mittel von vier Messungen.

2. Einfluß von Pflanzensaft auf die Aktivität von Antibiotika

Die Anwendung der Antibiotika wird durch die Tatsache erschwert, daß sie von anderen vorhandenen Substanzen (Kationen oder organischen Stoffen) adsorbiert und somit inaktiviert werden. Dieses trifft sowohl für Körperflüssigkeit (Klein 1957), Milch (Price, Zolli, Atkinson u. Luther 1957), Boden und Pflanzensaft (Dye 1956 a u. b) zu. Diese Inaktivierung muß bei der Applikation von Antibiotika zu irgendeinem Medium in Betracht gezogen werden und auch, wenn Antibiotika quantitativ in den entsprechenden Medien bestimmt werden.

Aber nicht nur eine Aktivitätsminderung kann erfolgen, sondern auch eine Aktivitätssteigerung durch natürlich anwesende Inhibitoren (Klein 1957, Krüger 1957, 1961). Gegen diese Hemmstoffe sensitive Bakterien können schnell erkannt und verworfen werden. Wie aber Versuche gezeigt haben, reagierten einige Bakterien nicht mit einer Hemmung, wenn der Saft allein appliziert wurde, sondern erst dann, wenn ein Antibiotikum hinzutrat, wie für Penicillin und Streptomycin bereits beschrieben.

Für die Analyse von Antibiotika wurden daher mehrere Bakterien auf ihre Brauchbarkeit nach folgender Methode geprüft. Bekannte Antibiotikakonzentrationen wurden sowohl in Wasser wie auch in Saft von a) ganzen Pflanzen, b) von Blättern und c) von Stengeln gelöst. Die Ergebnisse für die geeignetsten Bakterien sind graphisch in den Abbildungen 1 bis 9 dargestellt.

Pencillin (Abb. 1), Chloramphenicol (Abb. 5) und Vancomycin (Abb. 2) wurden am geringsten adsorbiert. Die Aktivität von Penicillin und Vancomycin wurde sogar bei niedrigen Konzentrationen durch Saft gesteigert. Wenn geringe Mengen von Antibiotika in Pflanzen zu erwarten sind, dann müssen

für die Bestimmung dieser beiden Antibiotika Verdünnungsreihen mit Saft als Lösungsmittel verwendet werden, andernfalls sind die resultierenden Werte höher als der aktiven Antibiotikamenge entspricht.

Erythromycin (Abb. 6), Oleandomycin (Abb. 4), Streptomycin (Abb. 3), Agrimycin 100 (Abb. 7), Novobiocin (Abb. 2), Bacitracin (Abb. 5) und Thiolutin (Abb. 3) dürften der Reihenfolge entsprechend als mäßig adsorbierbar angesprochen werden. Endomycin (Abb. 1) wurde sehr stark inaktiviert, und 300 γ/ml waren notwendig, um eine Aktivität im Saft zu erreichen.

Diese Ergebnisse resultierten, wenn der Saft der oberirdischen Pflanzenteile gemeinsam verwendet wurde. Ein Unterschied bestand aber im Grad der Adsorption durch Saft von Blättern und Stengeln. Beispiele sind in Abbildung 9 für Oleandomycin und Vancomycin gegeben. Der Verlauf der Oleandomycin-Kurven ist charakteristisch für die meisten der Antibiotika. Saft von Blättern inaktivierte mehr Oleandomycin als Saft von Stengeln.

Mit Vancomycin wurden ähnliche Ergebnisse erhalten, aber der Saft von Stengeln enthielt eine Substanz, die den Effekt von Vancomycin bei niedrigen Konzentrationen erhöhte und die Erscheinung des Synergismus demonstrierte.

Abb. 1 bis 9. Aktivität von Antibiotika im Saft von Tomatenpflanzen und in Wasser, bestimmt mit den folgenden Testbakterien

Agrimycin 100 (γ/ml)	*E. coli*/Typ III
Bacitracin (E/ml)	*S. lutea*
Chloramphenicol (γ/ml)	*E. coli*/Typ III
Chlortetracyclin (γ/ml)	*E. coli*/Typ III
Endomycin (γ/ml)	*S. lutea*
Erythromycin (E/ml)	*S. lutea*
Novobiocin (γ/ml)	*S. lutea*
Oleandomycin (γ/ml)	*S. lutea*
Oxytetracyclin (γ/ml)	*E. coli*/Typ III
Penicillin G (E/ml)	*E. coli*/Typ III
Streptomycin-sulfat (E/ml)	*E. coli*/Typ III
Thiolutin (E/ml)	*S. lutea*
Vancomycin (E/ml)	*S. lutea*

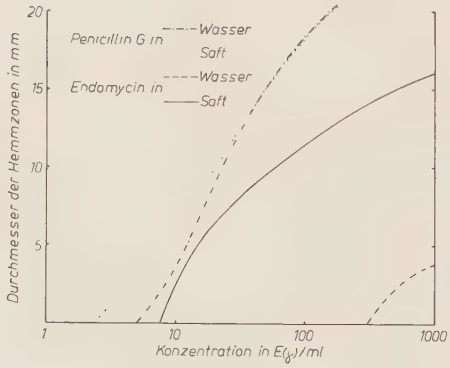


Abb. 1

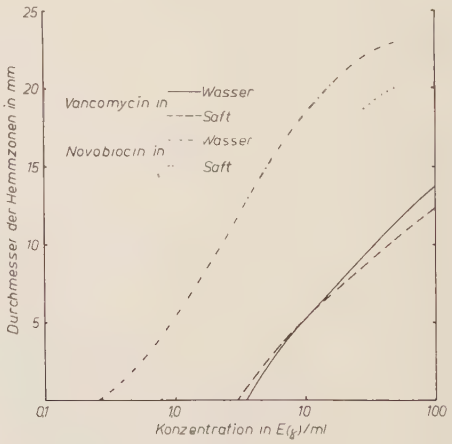


Abb. 2

Der Grad der Adsorption differierte nicht nur für jedes Antibiotikum, sondern zeigte bei einigen Antibiotika auch eine Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums. Keine Unterschiede im Grad der Adsorption hoher und niedriger Konzentration wurden mit Thiolutin, Oleandomycin, Novobiocin und Endomycin beobachtet. Die beiden Aktivitätskurven verliefen bei diesen Antibiotika parallel, es wurde folglich nur ein gleichbleibender Prozentsatz adsorbiert, wenn man von den ganz niedrigen Konzentrationen absieht, die völlig adsorbiert wurden.

Geringfügig stärkere Adsorption bei niedrigen Konzentrationen wurde mit Oxytetracyclin und Erythromycin und stärkere Inaktivierung mit Agri-

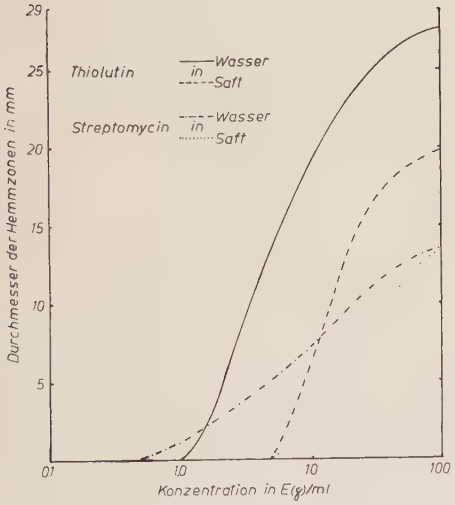


Abb. 3

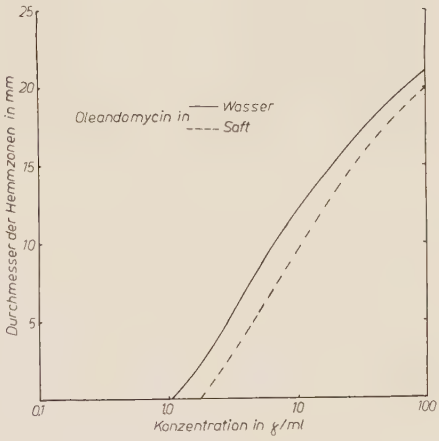


Abb. 4

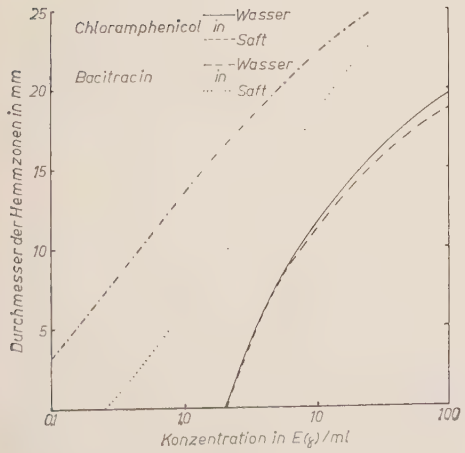


Abb. 5

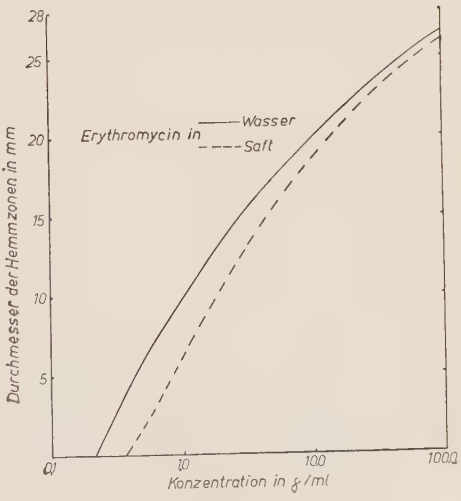


Abb. 6

mycin 100, Chlortetracyclin und Streptomycin erfahren. Bei diesen Antibiotika wurde bei größerem Antibiotikaangebot relativ weniger Substanz adsorbiert. Es schien somit eine gewisse Sättigung der Adsorptionsstellen eingetreten zu sein.

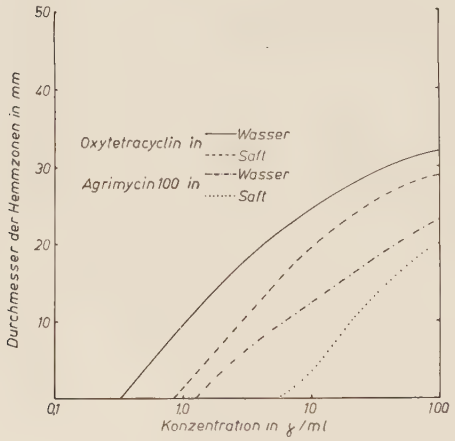


Abb. 7

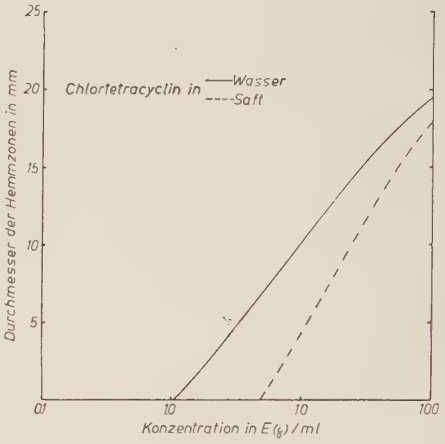


Abb. 8

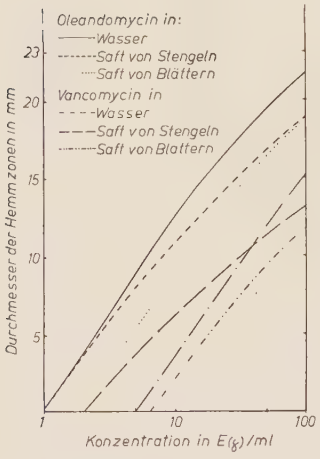


Abb. 9

Ein umgekehrtes Verhalten wurde bei Chloramphenicol, Penicillin und Vancomycin wahrgenommen. Diese Reaktion kann folgende Ursache haben: a) Eine geringe effektsteigernde Wirkung der Antibiotika durch natürlich anwesende Hemmstoffe, die aber nicht so stark ist, um die Adsorption zu überdecken. Eine stärkere Adsorption bei höheren Konzentrationen wird daher vorgetäuscht. b) Die Adsorption nimmt mit steigendem Angebot von Antibiotika zu.

Die zuerst angeführte Erklärung sollte die wahrscheinlichere sein, denn wie für Vancomycin gefunden wurde, enthielt der Saft von Stengeln eine Komponente, die die Wirkung des Antibiotikums erhöhte.

BESPRECHUNG

Die hier besprochenen Ergebnisse der quantitativen Bestimmung von Antibiotika in Pflanzen zeigen, daß gewöhnlich nur ein Prozentsatz der Antibiotika effektiv bleibt. Bei der Berechnung der Antibiotikakonzentration muß darauf geachtet werden, welcher Anteil des Antibiotikums in der Pflanze erfaßt werden soll, der aktive oder der gesamte. Bei der Bestimmung des aktiven Anteiles ist auf das Vorhandensein von Synergismus und Adsorption in der

Testflüssigkeit zu achten. Liegen synergistische Effekte vor, dann sollte Saft als Lösungsmittel für die Standardreihen benutzt werden. Eine wäßrige Lösung als Standard würde höhere Werte ergeben.

Hat eine Adsorption stattgefunden, so wäre die „Saftserie" fehl, weil dann der aktive und adsorbierte Anteil erfaßt wird. In dem Falle liefert die „Wasserreihe" die angemesseneren Werte.

Für die verschiedenen Antibiotika wurden die Bakterien ausgewählt, die die zuverlässigsten Konzentrationen bei der Pflanzenanalyse widerspiegelten. Es wurde dabei von dem Standpunkt ausgegangen, daß die Bakterien zu bevorzugen sind, die nicht auf das Zusammenwirken von Antibiotika und Inhibitor des Pflanzensaftes reagierten. Für die meisten Antibiotika wurden entsprechende Bakterien gefunden, wie aus den graphischen Darstellungen hervorgeht. Bakterien, die auf den Inhibitor oder Synergismus ansprachen, wurden nicht verwendet, sofern sie durch ein anderes Bakterium ersetzt werden konnten.

Penicillin G und Vancomycin waren die beiden Antibiotika, die mit beiden Standardreihen (Saft und Wasser) geprüft werden müssen, weil bei niedrigen Konzentrationen ein Synergismus zu beobachten war.

Zusammenfassung

1. Die Papierblättchen- und die Lochmethode wurden auf ihre Brauchbarkeit für die quantitative Bestimmung von Antibiotika in Pflanzensaft geprüft.

2. Durch kontaminierende Bakterien im Saft wurde die Blättchenmethode weniger zutreffend. Der Lochmethode wurde der Vorzug gegeben.

3. Der Saft von Tomatenpflanzen enthielt Stoffe, die Antibiotika adsorbierten oder aber in der Wirkung steigerten. Welcher Effekt sichtbar wurde, hing von den Testbakterien ab.

4. Allgemein hatte der Saft von Blättern mehr adsorbierende Eigenschaften als Saft von Stengeln.

5. Der Grad der Adsorption durch Saft war von Antibiotika zu Antibiotika verschieden. Die Stärke der Adsorption war bei einigen Antibiotika auch konzentrationsbedingt.

6. Für die quantitative Bestimmung von Antibiotika im Pflanzensaft eignen sich solche Bakterien, die weder durch Saft selbst, noch durch Synergismus beeinflußt werden.

Summary

1. The paper-dics and hole-plate methods were tested for their suitability for the quantitative determination of antibiotics in plant sap.

2. Contaminating bacteria in the sap made the paper-disc method less suitable. The preference was given to the hole plate method.

3. The sap of tomato plants contained substances which adsorbed the antibiotics or, conversely, increased their effect. Which of these effects was observed depended on the test bacteria.

4. In generel the leaf sap had more adsorbing properties than the sap from stems.

5. The degree of adsorption by the sap was different for different antibiotics. The amount of adsorption was also dependent on the concentration for certain antibiotics.

6. Those bacteria which are influenced neither by the sap itself nor by synergism are the most suitable for the quantitative determination of antibiotics in plant sap.

Literaturverzeichnis

Crowdy, S. H., 1957: The uptake and translocation of griseofulvin, streptomycin and chloramphenicol in plants. Ann. appl. Biol. **45**, 208—215.

— —, and D. Pramer, 1955: Movement of antibiotics in higher plants. Chemistry & Industry **7**, 160—162.

— —, and — —, 1955 a: The occurrence of translocated antibiotics in expressed plant sap. Ann. Bot. **19**, 79—81.

— —, D. Gardner, J. F. Grove, and D. Pramer, 1955: The translocation of antibiotics in higher plants. I. Isolation of griseofulvin and chloramphenicol from plant tissue. J. Exp. Bot. **6**, 371—383.

De Beer, E. J., and Marion B. Sherwood, 1945: The paper-disc agarplate method for the assay of antibiotic substances. J. Bact. **50**, 459—467.

Dye, M. H., 1956: Studies on the uptake and translocation of streptomycin by peach seedlings. Ann. appl. Biol. **44**, 567—575.

— —, 1956 a: Intake of streptomycin by peach leaves. Nature **178**, 551—552.

Gray, R. A., 1958: The downward translocation of antibiotics in plants. Phytopathology **48**, 71—78.

Klein, P., 1957: Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis. Springer-Verlag, Berlin — Göttingen—Heidelberg.

Krüger, W., 1957: Die Beeinflussung des biologischen Streptomycinnachweises bei Tomaten durch ein dortselbst vorkommendes Antibiotikum. Verh. IV. Intern. Pflanzenschutz-Kongreß, Hamburg 1957, Bd. 2 (Braunschweig 1960), 1595—1600.

— —, 1961: Die Konzentrationsbestimmung von Penicillin und Streptomycin in Tomatenpflanzen. Phytopath. Z. **42**, 139—149.

Lemin, A. J., and W. E. Magee, 1957: Degradation of cycloheximide derivatives in plants. Plant Dis. Reptr. **41**, 447—448.

Linton, A. H., 1958: Influence of inoculum size on antibiotic assays by the agar diffusion technique with *Klebsiella pneumonia* and streptomycin. J. Bact. **76**, 94—103.

Mehta, P. P., D. Gottlieb, and D. Powell, 1959: Vancomycin, a potential agent for plant disease prevention. Phytopathology **49**, 177—183.

Mitchell, J. W., W. J. Zaumeyer, and W. H. Jr. Preston, 1954: Absorption and translocation of streptomycin by bean plants and its effect on the halo and common blight organisms. Phytopathology **44**, 25—30.

Pramer, D., 1953: Observations on the uptake and translocation of five actinomycete antibiotics by cucumber seedlings. Ann. appl. Biol. **40**, 617—622.

Price, K. E., Z. Jr. Zolli, J. C. Atkinson, and H. G. Luther, 1957: Antibiotic inhibitors. I. The effect of certain milk constituents. Antibiotics and Chemother. **7**, 672—688.

Wallen, V. R., and R. L. Millar, 1957: The systemic activity of cycloheximide in wheat seedlings. Phytopathology **47**, 291—294.

Wells, J. S., R. C. Anderson, and K. K. Chen, 1955: A metabolite of erythromycin. Antibiotics Annuals 1954/55, 291—294.

Department of Plant Pathology, Cornell University, Ithaca, New York and Division of Laboratories and Research, New York State Department of Health, Albany

Fine Structure of Mycota

8. On the Aecidial Stage of *Uromyces caladii*[1])

by

Royall T. Moore and James H. McAlear[2])

With 7 figures

There are, as far as we are aware, only a few phytopathological studies utilizing the electron microscope, and of those that are available most have been concerned with pathogenic Phycomycetes and none that we know of have investigated the micromorphology of the rusts. In view of the great economic importance of the Uredinales this is surprising; however, it may be a reflection of the unfortunate current trend to segregate the modern laboratory sciences from the older field sciences. That is, the rusts and a number of other fungi have not yet been brought into culture and we are, therefore, still obliged to study the ontogeny and morphology of these organisms from nature as the season provides them.

The aecidial stage of *Uromyces caladii* (Schw.) Farlow occurs in the spring as a frequent parasite on the leaves of the Jack-in-the-Pulpit (*Arisaema triphyllum* [L.] Schott.), a common wild plant of north-eastern North America. Pustules were cut from the leaves, pre-fixed 5 min. in aqueous, unbbuffered 2% $KMnO_4$ and then fixed about 5 hrs. in buffered 2% OsO_4 at 4 °C. Subsequently they were washed in buffer alone, dehydrated in an ethanol series and embedded in a methacrylate mixture. (Details of this procedure are available

1) This work was supported in part by Grant no. H-3493 from The National Heart Institute, Public Health Service, and in part by a resarch fellowship, 9197-Cl, to the senior author from the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Prof. R. P. Korf, sponsor.

2) Present address: Electron Microscope Laboratory, University of California, Berkeley.

in the first paper in this series [MOORE 1962].) Sections were cut on a Sorval Porter-Blum ultramicrotome using a FERNÁNDEZ-MORÁN diamond knife and examined in a Siemens Elmiskop I electron microscope.

Figures 1—3 are observations of aecidiospore production. At low magnification Figure 1 represents various stages of aecidiospore formation. One is able in this figure to establish an ontogenic progression from a common wall between aecidiospore (a) and disjunctor cell (d) through a thickening and splitting of this common wall to finally a complete separation of mature aecidiospores with thick, strongly roughened walls. Figure 2 is a high magnification observation of an early stage in differentiation of respective cell walls and in which one may note the beginning of the cleavage line (wedges). Figure 3 shows at higher magnification a portion of a mature aecidiospore. It is a dikaryotic cell containing two nuclei (n) that, typical for fungal nuclei, are seen to be composed of a dark (electron dense), fine granular, and a lighter (electron transparent), coarse granular material. Other inclusions are mitochondria (m), granules (g) believed to be lipid, and a light appearing material (×) that may be carotene. This figure also illustrates the nature of the spore coat. It consists of a continuous wall (w) from which project tubercles or cogs (c); between these cogs are electron dense inter-cog particles (icp) that apparently fall out in the course of maturation.

Figures 4—7 are various aspects of the haustoria. Figure 4 is a longitudinal section showing a terminal swelling similar to that depicted for this fungus by RICE (1934) with light optics. The nucleus (n) is comparable in composition to those shown in Figure 3 but it is unusual in its elongate extension into the haustorial bulb; note also the prominent pores (arrows). We believe that this particular area represents an early infection stage as the host tissue (H) is still well organized.

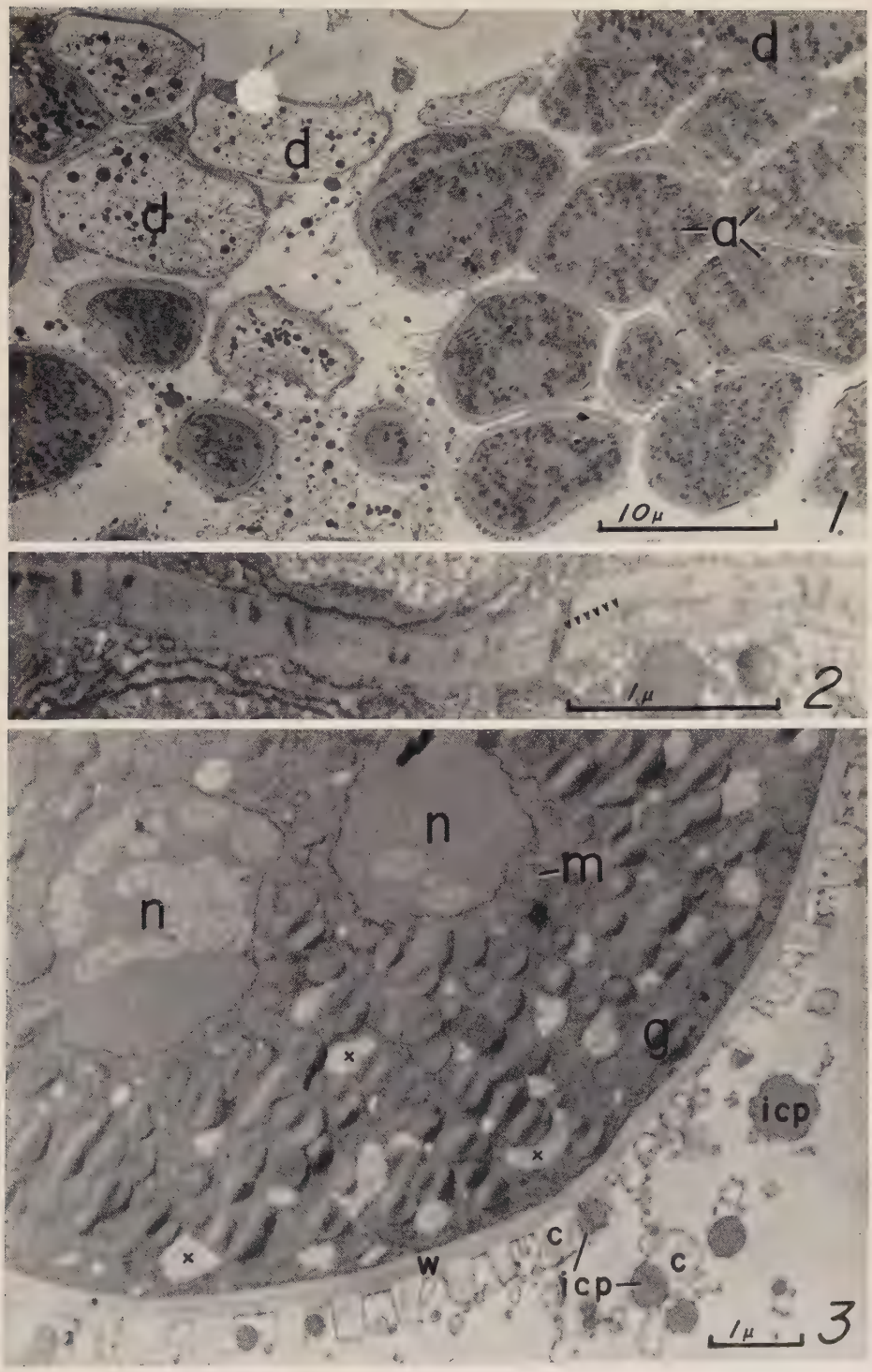
The remaining micrographs are interpreted as cross sections of haustoria. Figure 5 shows typical granules (g) and nucleus (n) but of particular interest is the (×)-material that, like the similar deposits in Figure 3, is believed to be carotene. The mitochondria ([m]. Figures 6, 7) of the fungus are unusual in

---

Fig. 1. Portion of an aecidium. The disjunctor cells (d) appear, at least in part, to be smooth and upon maturity become vacuolated; aecidiospores in the course of maturation become roughened — various stages in their ontogeny are observable.
Approximately × 2,500

Fig. 2. Portion of the common wall between an aecidiospore and a disjunctor cell during early differentiation — a cleavage line (wedges) is just beginning to appear.
Approximately × 30,000

Fig. 3. Portion of a mature aecidiospore. The cell is dikaryotic and each nucleus (n) presents a typical mottled appearance; other discernible inclusions are mitochondria (m), granules (g) believed to be lipid, and an electron transparent material (×) that may be carotene. The spore coat consists of a continuous inner wall (w) from which tubercles or cogs (c) project, between these cogs occur inter-cog particles (icp) that apparantly fall out in the course of maturation.
Approximately × 12,500


d
d
d
d
a
10μ
1
2
1μ
2
n
n
m
g
icp
c
w
c
icp
c
1μ
3

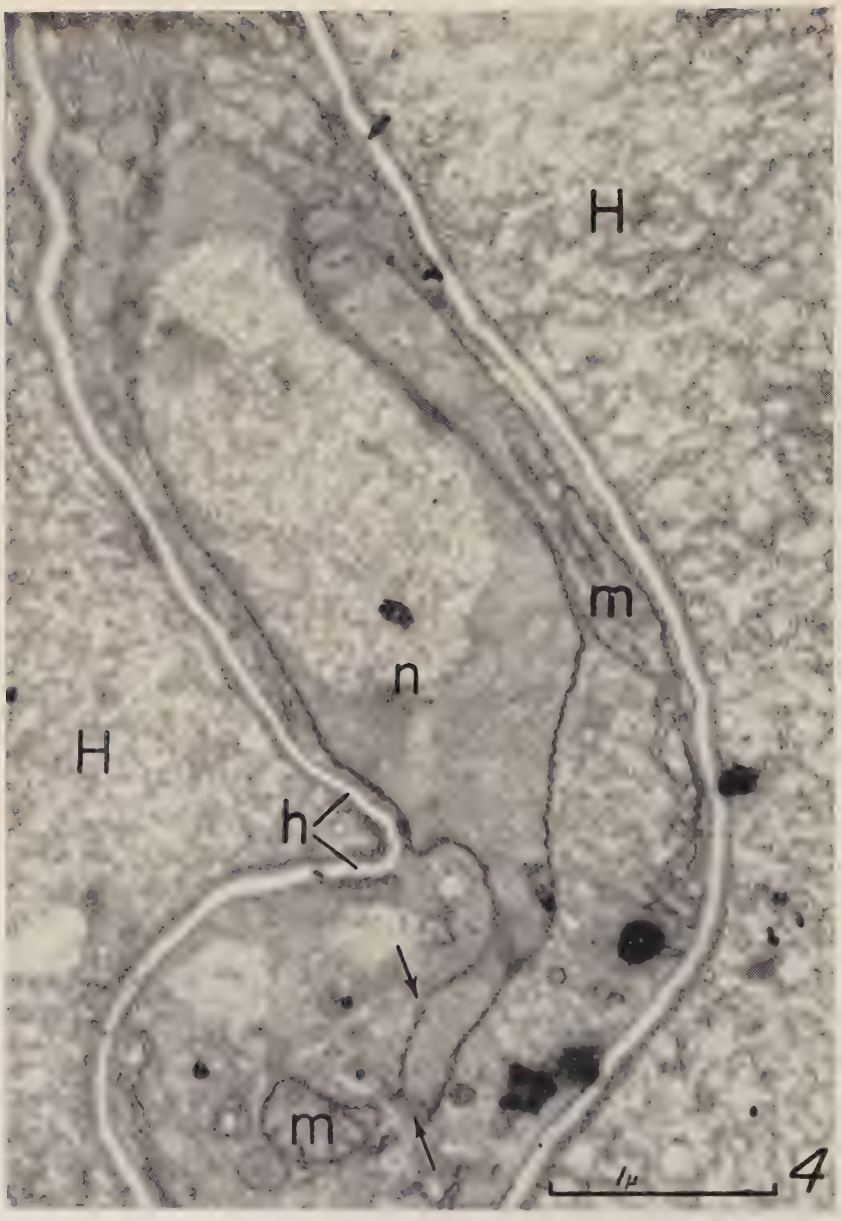
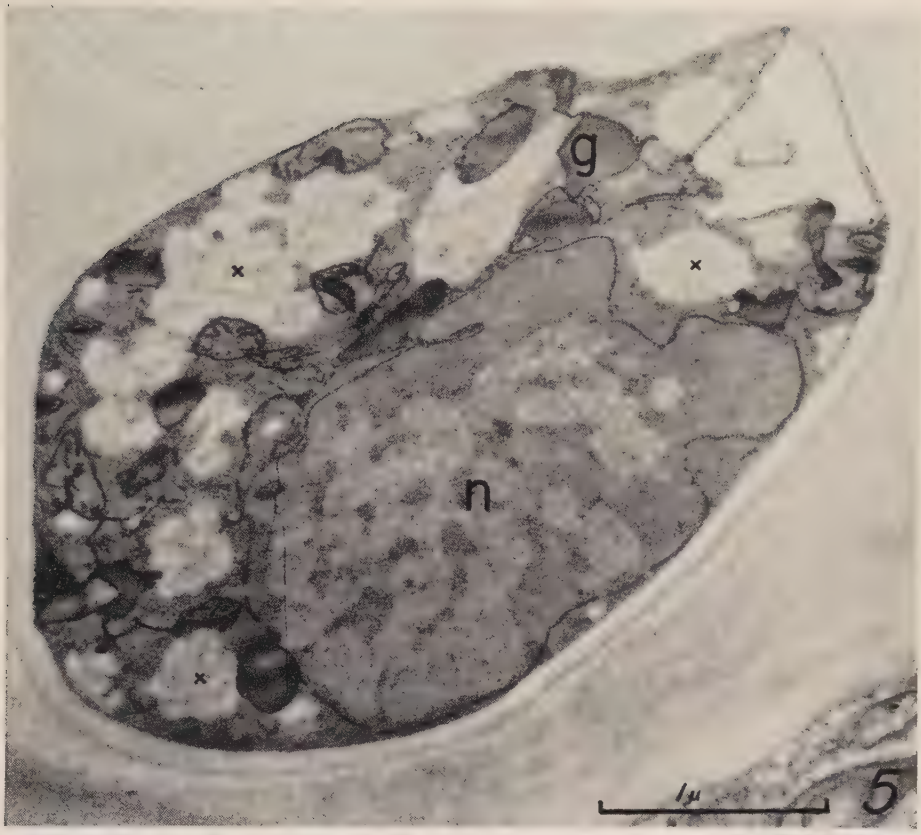
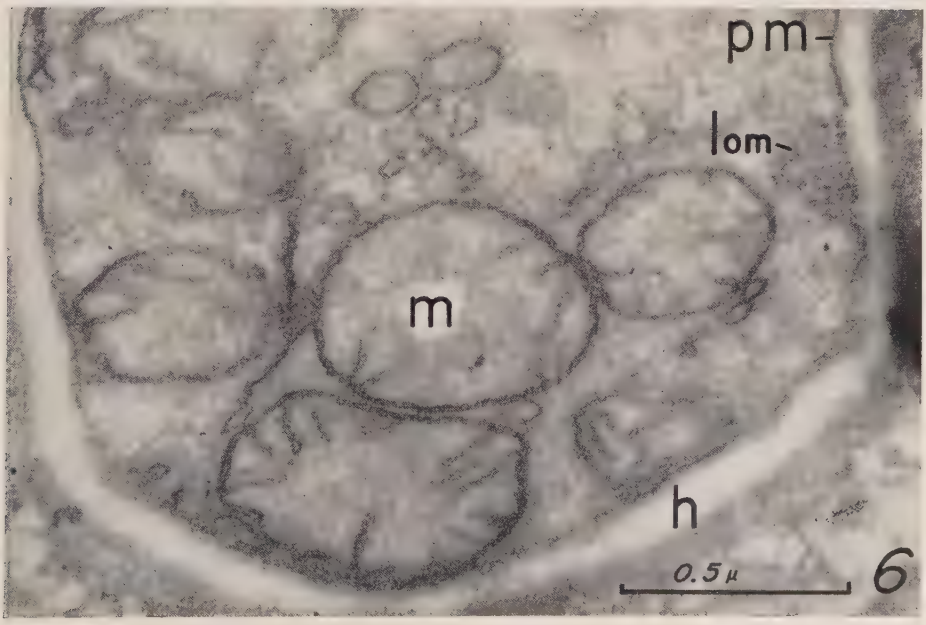


Fig. 4. Longitudinal section of a haustorium (h — haustorial wall). The nucleus (n) shows a rather unusual projection which may be observed to terminate in a large pore (lower arrow), a smaller nuclear pore is also visible (upper arrow). One of the mitochondria (m) has been strongly compressed by the nucleus. The ground cytoplasm of the host cell (H) appears to be still vital, suggesting an early stage of infection. Approximately × 60,000

Fig. 5. Cross section of a haustorium showing a typical nucleus (n), probable lipid inclusions (g), and material similar to that seen in Fig. 3 that may be carotene (×). Approximately × 30,000

Fig. 6. Portion of a haustorium showing mitochondria (m) typical for this fungus and containing cristae, a lomasome (lom) contiguous with the haustorial wall (h) and bounded on the inside by the plasma membrane (pm). Approximately × 60,000


g
n
1μ
5


pm
lom
m
h
0.5μ
6

h
er
m
PpM
M
G
0.5μ
7

the small number of cristae they contain. A lomasome (lom) may be observed in Figure 6. This prominent structure is contiguous with the haustorial wall (h) and is bounded on its inner surface by the plasma membrane (pm). Lomasomes have been reported for a number of fungi representing all classes of the Eumycota (MOORE and MCALEAR 1961). The relationship between the host and its parasite is shown in Figure 7. Here the haustorium is still bounded on the outside by the protoplast membrane (PpM) of the host. The contrast between the host tissue of this figure and that of Figure 4 is remarkable. In this figure the effects of parasitism are quite evident. The ground cytoplasm of the host has all but disappeared through probable lysis and the host mitochondria (M) and Golgi apparatus (G) are severely disrupted in comparison to the way these structures normally appear in higher plant cells (WHALEY et al. 1959).

Summary

Some aspects of the micromorphology of the aecidiospore stage of the rust *Uromyces caladii* have been presented in a series of electron micrographs. One group of micrographs shows at several magnifications the fine structure of the aecidiospores and disjunctor cells. A second group of micrographs shows various appearances of the haustoria and includes observations on their internal microanatomy (mitochondria, nuclei, endoplasmic reticulum, probable lipid, and possible carotene) and of the effects of their invasion on the micromorphology of the host.

Zusammenfassung

In einer Reihe elektronenmikroskopischer Aufnahmen sind Bilder von der Mikromorphologie des Rostpilzes *Uromyces caladii* im Äzidiosporen-Stadium dargestellt worden.

Eine Gruppe dieser Aufnahmen zeigt die Feinstruktur der Äzidiosporen und der Absonderungszellen bei starker Vergrößerung.

Die zweite Gruppe zeigt verschiedene Erscheinungen der Haustorien und die Wirkung ihres Eindringens auf die Mikromorphologie der Wirtspflanze. Betrachtungen der inneren Mikroanatomie der Haustorien lassen Mitochondrien, Kerne und das endoplasmatische Retikulum erkennen. Weitere Einschlüsse bestehen wahrscheinlich aus Lipoiden bzw. aus Karotin.

Fig. 7. Inter-relation of host and parasite. The haustorium (h — haustorial wall) contains a continuous-phase ground cytoplasm containing endoplasmic reticulum (er) and sparcely cristate mitochondria (m); it is bounded on the outside by the protoplast membrane (PpM) of the host cell. The host cell appears necrotic with evidence of lysing of the ground cytoplasm (compare with Fig. 4), the Golgi apparatus (G), and the mitochondria (M) that suggests a late stage of infection. Approximately × 60,000

Literature cited

MOORE, R. T., 1962: Fine structure of mycota. 1. Electron microscopy of the discomycete *Ascodemsis*. Nova Hedwigia (in press).

— —, and J. H. MCALEAR, 1961: Fine structure of mycota. 5. Lomasomes — previously unreported hyphal structures. Mycologia (in press).

RICE, MABEL A., 1934: The relation of *Uromyces caladii* and other rusts to their hosts. Bull. Torrey Bot. Club **61**, 155—161.

WHALEY, W. G., JOYCE E. KEPHART, and H. H. MOLLENHAUER, 1959: Developmental changes in the Golgi-apparatus of maize root cells. Amer. J. Bot. **46**, 743—751.

Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Begründet von PAUL SORAUER

Herausgegeben von Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL †, Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK †, Prof. Dr. B. RADEMACHER, Direktor des Instituts für Pflanzenschutz der Landwirtschaftlichen Hochschule, Stuttgart-Hohenheim, Prof. Dr. H. RICHTER, Berlin und Braunschweig.

I. Band: nichtparasitären Krankheiten

7. Aufl. in 4 Lieferungen, herausg. von Prof. Dr. B. RADEMACHER. *In Vorbereitung*

II. Band: Die Virus- und bakteriellen Krankheiten

6. Auflage in 2 Lieferungen, herausgegeben von Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL und Prof. Dr. H. RICHTER.

1. Lieferung: **Viruskrankheiten**
1954. 786 Seiten mit 326 Abbildungen. Ganzleinen DM 150,—

2. Lieferung: **Bakterielle Krankheiten**
1956. 575 Seiten mit 179 Abbildungen. Ganzleinen DM 124,—

III. Band: Die pilzlichen Krankheiten

6. Auflage in 6 Lieferungen, herausgegeben von Prof. Dr. H. RICHTER.

4. Lieferung: **Basidiomycetes**
Etwa 700 Seiten mit vielen Abbildungen. Erscheint Winter 61/62

Lieferung 1, 2, 3, 5 und 6 in Vorbereitung

IV. Band: Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen, 1. Teil

5. Auflage in 2 Lieferungen, herausgegeben von Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK.

1. Lieferung: **Protozoa und Metazoa partim**
1949. 458 Seiten mit 210 Abbildungen Ganzleinen DM 44,—

2. Lieferung: **Trichoptera, Lepidoptera**
1953. 526 Seiten mit 154 Abbildungen. Ganzleinen DM 116,—

V. Band: Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen, 2. Teil

5. Auflage in 5 Lieferungen, herausgegeben von Prof. Dr. Dr. h. c. H. BLUNCK.

1. Lieferung: **Diptera und Hymenoptera**
1953. 320 Seiten mit 89 Abbildungen. Ganzleinen DM 80,—

2. Lieferung: **Coleoptera**
1954. 608 Seiten mit 157 Abbildungen. Ganzleinen DM 144,—

3. Lieferung: **Heteroptera und Homoptera 1. Teil**
1956. 408 Seiten mit 128 Abbildungen. Ganzleinen DM 94,—

4. Lieferung: **Homoptera 2. Teil (Aphidoidea, Coccoidea)**
1957. 586 Seiten mit 257 Abbildungen. Ganzleinen DM 147,—

5. Lieferung: **Vertebrata**
1958. 414 Seiten mit 134 Abbildungen. Ganzleinen DM 88,—

VI. Band: Pflanzenschutz

2. Auflage in 4 Lieferungen, herausgegeben von Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL und Prof. Dr. H. RICHTER.

1. Lieferung: **Wirtschaftliche Bedeutung und Hygiene des Pflanzenschutzes**
1952. 464 Seiten mit 3 Abbildungen. Ganzleinen DM 78,—

3. Lieferung: **Biologische Schädlingsbekämpfung. Die technischen Mittel des Pflanzenschutzes**
1961. 643 Seiten mit 380 Abbildungen. Ganzleinen DM 190,—

Lieferung 2 und 4 in Vorbereitung.

Die Lieferungen der Bände sind einzeln käuflich. Besteller, die sich zur Abnahme aller Lieferungen eines der Bände verpflichten, erhalten auf die angegebenen Preise des betreffenden Bandes einen Nachlaß von 10 %.

VERLAG PAUL PAREY · BERLIN UND HAMBURG

Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur

Herausgegeben von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem

Bearbeitet von Reg.-Rat Dr. J. BÄRNER

1940—1945 Zwei Bände	1356 Seiten. Broschiert DM 126,—
1946—1947	501 Seiten. Broschiert DM 66,—
1948—1949	730 Seiten. Broschiert DM 115,—
1950	479 Seiten. Broschiert DM 59,—
1951	464 Seiten. Broschiert DM 60,—
1952	474 Seiten. Broschiert DM 65,—
1953	569 Seiten. Broschiert DM 94,—

Weitere Bände befinden sich in Vorbereitung. Durch diese Literaturzusammenstellungen werden der wissenschaftlichen Forschung wie der Praxis die Erfahrungen und Entwicklungen des Auslandes zugänglich gemacht, und es dokumentiert sich darin die Bedeutung, die dem Pflanzenschutz überall in der Welt beigemessen wird.

Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem

Heft 100: **Das Trichogramma-Problem**
Von Dr. K. MAYER und Dr. W. QUEDNAU
50 Seiten mit zahlreichen Abbildungen im Text und auf Tafeln.
Kartoniert DM 9,60

Heft 101: **Standorteinflüsse und natürliche Feinde als Begrenzungsfaktoren von Melolontha-Larvenpopulationen eines Waldgebietes (Forstamt Lorsch, Hessen)**
(*Coleoptera: Scarabaeidae*)
Von Dr. O. F. NIKLAS
60 Seiten mit 9 Abbildungen. Kartoniert DM 8,30

Heft 102: **Zur Toxikologie der Insektizide**
Literaturübersicht / 2. Teil: Toxaphen-Gruppe
Von Dr. W. GRUCH und Dr. P. STEINER
64 Seiten mit zahlreichen Tabellen. Kartoniert DM 11,30

Heft 103: **Bacillus thuringiensis Berliner**
Über seine Biologie, Pathogenie und Anwendung in der biologischen Schädlingsbekämpfung
(In memoriam Dr. ERNST BERLINER, 1880—1957)
Von Dr. A. KRIEG
79 Seiten mit zahlreichen Tabellen und Abbildungen. Kartoniert DM 12,40

Ab 1. Juli 1961 wurden von der Biologischen Bundesanstalt die Preise für die Jahrgänge 1914 bis 1953 der „Bibliographie der Pflanzenschutzliteratur" und die Hefte 1 bis 99 der „Mitteilungen der BBA" neu festgesetzt. Die Preisliste kann beim Verlag angefordert werden.

VERLAG PAUL PAREY · BERLIN UND HAMBURG